



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical
MESTRADO EM PARASITOLOGIA MÉDICA



**Monitorização da ocorrência de enteroparasitoses e de
anemia em crianças em idade escolar e deteção
molecular dos isolados, em Salina-Pedra Badejo, Ilha de
Santiago, Cabo Verde**

Mónica Sofia Neves Garcia

LISBOA, 2017



FUNDAÇÃO
CALOUSTE GULBENKIAN
BOLSAS

**Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Monitorização da ocorrência de enteroparasitoses e de anemia em
crianças em idade escolar e deteção molecular dos isolados, em
Salina-Pedra Badejo, Ilha de Santiago, Cabo Verde**

Mónica Sofia Neves Garcia

Orientadora: Professora Doutora Olga Matos

Co-orientadora: Investigadora Doutora Maria Luísa Lobo

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Olga Matos e coorientação científica da Investigadora Doutora Maria Luísa Lobo. Apoio financeiro da Fundação Calouste Gulbenkian com bolsa para a realização do Mestrado

Dedico este trabalho ao meu amado filho pelos lindos momentos
que me proporcionou durante a elaboração deste trabalho.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela graça concedida e por me ter dado vida e saúde, capacidade e sabedoria para realizar este trabalho e por me presentear com pessoas tão importantes que me deram imensuráveis oportunidades e apoios.

A elaboração deste trabalho não seria possível sem a ajuda e colaboração de algumas pessoas e instituições que foram fundamentais para a sua realização, às quais gostaria de agradecer:

A Fundação Calouste Gulbenkian, pela concessão da bolsa de estudo, porque sem esse grande apoio não teria como fazer o Mestrado em Parasitologia Médica.

À Professora Doutora Olga Matos, minha orientadora, pessoa de extrema importância para a realização deste trabalho. Os meus profundos e sinceros agradecimentos por ter aceitado orientar este trabalho, pela amizade, confiança, paciência, incentivo, críticas e ensinamentos transmitidos durante todo o período de realização do mestrado o que contribuiu positivamente para o meu crescimento profissional.

À Investigadora Doutora Maria Luísa Lobo, minha coorientadora, pela sua grandiosa e inestimável contribuição e pela sua incontestável e incontornável experiência em coordenar trabalhos laboratoriais, somada ao seu espírito de liderança, fizeram de mim uma discípula da sua sabedoria.

À Professora Doutora Luzia Gonçalves pelos ensinamentos, incentivo, conselhos, amizade, e pela ajuda preciosíssima no tratamento dos dados no programa SPSS e pelos conhecimentos transmitidos que enriqueceram ainda mais o trabalho.

À Delegada de Saúde de Santa Cruz, Doutora Ângela Gomes, por ter aceitado fazer parte deste estudo e por ter contribuído com ideias, materiais, por ter disponibilizado pessoal da delegacia para no estudo de campo, e pelas consultas que serão ministradas aos alunos com parasitoses intestinais o que contribui para o sucesso deste estudo e a sua importância social.

Ao Professor Doutor Jorge Tavares, presidente da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Cabo Verde por ter permitido que parte do estudo laboratorial fosse feito na Universidade.

À técnica responsável do Laboratório de Análises Clínicas da Delegacia de Saúde de Santa Cruz, Eunice Pereira, pela disponibilidade em ajudar na colheita e análise sanguínea dos alunos.

À enfermeira, Artemiza Andrade, pelo apoio e companhia feita durante a aplicação e recolha das amostras.

Também, agradeço ao Gestor da Escola Primária de Salina pela autorização e contributo dado na realização deste estudo.

Aos professores, secretária e cozinheiras da Escola Primária de Salina, pela contribuição dada e por aceitarem prontamente participar no estudo.

Muito obrigada a todos os pais e encarregados de educação dos alunos da Escola Primária de Salina-Santa Cruz, por terem acreditado neste trabalho e por aceitarem que os seus filhos participassem do estudo.

A todos os professores que lecionaram no curso de Mestrados em Parasitologia Médica, um muito obrigado pelos seus ensinamentos, municípios, encorajamento e dedicação que tiveram connosco durante estes dois anos.

Igualmente gostaria de agradecer aos meus colegas de Mestrados em Parasitologia Médica turma 2014-2016, pelos bons momentos que passamos juntos, por todas as dificuldades que fomos capazes de superar como um grupo que somos, pelos trabalhos desenvolvidos em conjunto. Menciono o nome de três colegas, pela amizade que surgiu, tendo como ponto de partida o Mestrado e que espero dure para sempre. À Maria de Lourdes Francisco e Geraldina Manjate agradeço a amizade sincera e as palavras de encorajamento nas horas difíceis. À minha companheira de orientação, Livonilda Gomes, pelo espírito de equipa e entreajuda, cumplicidade, companheirismo e pela amizade que construímos.

Agradeço também aos meus pais e meus irmãos pela linda família que somos, o que me dá mais força e motivação para continuar e ir mais além.

Ao meu amado noivo, Ilson Pereira Martins, pelo amor, carinho, por ser “um homem por excelência”, que me entende e conhece melhor do que ninguém, mesmo quando a distância nos separa. Obrigada por transformar cada momento em que

estamos juntos em grandes momentos. Obrigada pelo amor, companheirismo, amizade e por me incentivar sempre a realizar os meus sonhos.

Às minhas amáveis amigas, Janise Gomes e Aleida Correia, pelo suporte, companhia, amizade e incentivo prestados e pelos bons momentos de descontração partilhados durante o período que estive em Cabo Verde.

Em especial agradeço aos meus tios, Maria Olinda Veiga e Cerilo Lopes por me terem aceitado de braços abertos durante os dois anos em que decorreu este curso de mestrado, particularmente à minha tia pelo exemplo de carácter e determinação, mas principalmente pelo amor e incentivo prestados e pelos bons momentos de descontração partilhados.

Agradeço a todos os que estiveram ligados direta ou indiretamente com o sucesso deste estudo. A essas pessoas expresso aqui os meus sinceros agradecimentos e espero um dia poder retribuir o que fizeram por mim.

Monitorização da ocorrência de enteroparasitoses e de anemia em crianças em idade escolar e deteção molecular dos isolados, em Salina-Pedra Badejo, Ilha de Santiago, Cabo Verde

Mónica Sofia Neves Garcia

Os enteroparasitas incluem um amplo grupo de organismos, dos quais os protozoários e os helmintas são os mais representativos. A sua prevalência é variável consoante a zona geográfica, dependendo das condições higio-sanitárias e climáticas, atingindo taxas de infeção máximas na África subsaariana, seguidas da Ásia, América Latina e Caribe. Em Cabo Verde as enteroparasitoses têm afetado muito as crianças em idade escolar, com maior incidência nas comunidades onde as condições socioeconómicas e ambientais favorecem a sua ocorrência. A principal forma de transmissão é a via fecal-oral, e/ou a partir da água ou alimentos contaminados. A morbilidade causada pelas enteroparasitoses, é muitas vezes relacionada com desnutrição e anemia, podendo resultar em deficiência no desenvolvimento físico e cognitivo das crianças.

Os objetivos do trabalho foram: (i) estimar a prevalência das enteroparasitoses em 416 crianças de um Jardim infantil e escolar primária e dos seus 17 professores e outros funcionários, com e sem sintomatologia gastrointestinal; (ii) identificar potenciais fatores de risco (sociodemográficos e ambientais) e a sua relação com as parasitoses intestinais identificadas no estudo; (iii) avaliar a ocorrência de anemia nas crianças que participaram no estudo e correlacionar com a frequência de enteroparasitas encontrada. As amostras de fezes de todos os participantes foram analisadas para identificação de protozoários e helmintas por métodos parasitológicos e os métodos de biologia molecular foram utilizados para deteção específica de *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e *Enterocytozoon bieneusi*.

Os resultados apontaram para maior prevalência de enteroparasitoses em crianças na faixa etária dos sete anos (15,4%), do sexo masculino (52,7%), cuja sintomatologia, na maioria dos casos, era dor abdominal (77,1%). Os responsáveis de mais de metade dos alunos, estudaram até ao ensino secundário (58,9%). Quanto aos hábitos de higiene das crianças, 59,1% disseram que defecavam ao ar livre sendo que destas 41,6% estavam parasitadas. No total das técnicas, a prevalência de enteroparasitas foi de 70%. Destes, 52,4% corresponderam a *Entamoeba coli*, 17,3% a *Giardia duodenalis*, 10,9% *Hymenolepis nana*, 7,6% *Enterocytozoon bieneusi*, 4,2% *Blastocystis hominis*, 0,7% *Cryptosporidium* spp., 0,5% *Ascaris lumbricoides* e 0,5% *Enterobius vermicularis*. Entre a população de crianças estudada, 22,4% apresentava anemia, com concentração de hemoglobina <11g/dl, sendo que 15,9% possuíam algum tipo de parasita. O desenvolvimento das crianças foi, na maioria dos casos, baixo quanto à altura para a idade <85% (76,9%), e peso para a idade <60% (73,1%). Neste estudo observaram-se poucos casos de poliparasitismo entre as crianças com anemia (3,4%).

Estes resultados, aliados ao conjunto de dados provenientes do levantamento dos fatores predisponentes às enteroparasitoses, possibilitaram um conjunto de reflexões acerca da importância das enteroparasitoses e de como elas representam um problema de saúde pública grave, e o seu relacionamento com fatores de risco a que os indivíduos estão expostos durante a vida, principalmente as crianças. Os dados epidemiológicos obtidos, neste estudo, salientam a importância do diagnóstico e do controlo das parasitoses intestinais, principalmente em crianças em idade escolar, representando um problema de saúde pública grave em Cabo Verde.

Palavras-chave: Enteroparasitas; Crianças em idade escolar; Anemia; Cabo Verde

Monitoring the occurrence of enteroparasitoses and anemia in school-age children and molecular detection of isolates in Salina-Pedra Badejo, Santiago Island, Cape Verde

Mónica Sofia Neves Garcia

Enteroparasites include a large group of organisms, of which protozoa and helminths are the most representative. Its prevalence varies according to geographical area, depending on hygienic and climatic conditions, reaching maximum infection rates in sub-Saharan Africa, followed by Asia, Latin America and the Caribbean. In Cape Verde, the enteroparasitoses have greatly affected school-age children, with a higher incidence in communities where socioeconomic and environmental conditions favour its occurrence. The main form of transmission is the faecal-oral route and/or from contaminated water or food. Morbidity caused by enteroparasitoses is often related to malnutrition and anaemia, and may result in deficits in the physical and cognitive development of children.

The objectives of the study were: (i) to estimate the prevalence of enteroparasitoses in 416 children of a kindergarten and an elementary school and their 17 teachers and school staff, with and without gastrointestinal symptoms; (ii) to identify potential risk factors (socio-demographic and environmental) and its relation with the intestinal parasites identified in the study; (iii) to evaluate the occurrence of anaemia in children who participated in the study and to correlate with the frequency of the enteroparasites identified.

Stool samples from all participants were analysed for protozoa and helminth identification by parasitological methods, and molecular biology methods were used for specific detection of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Enterocytozoon bieneusi*.

The results indicated a higher prevalence of enteroparasitoses in children aged 7 years (15.4%), males (52.7%), whose symptomatology in the majority of cases was abdominal pain (77.1%). The guardians (parents) of more than half of the students had a high school degree (58.9%). Regarding children's hygiene habits, 59.1% said they defecated in the open air and 41.6% were parasitized. In total, the prevalence of enteroparasites was 70%. Of these, 52.4% corresponded to *Entamoeba coli*, 17.3% to *Giardia duodenalis*, 10.9% to *Hymenolepis nana*, 7.6% to *Enterocytozoon bieneusi*, 4.2% to *Blastocystis hominis*, 0.7% to *Cryptosporidium* spp., 0.5% to *Ascaris lumbricoides* and 0.5% to *Enterobius vermicularis*. Among the population of children sampled, 22.4% had anaemia with haemoglobin concentration <11g / dl and 15.9% had some type of parasite. The development of the children studied was mostly low in terms of height for age <85% (76.9%), and weight for age <60% (73.1%). In this study, there were few cases of polyparasitism among children with anaemia (3.4%).

These results, together with the data gathered from the survey of factors predisposing to enteroparasitoses, provided a set of reflections about the importance of enteroparasitoses and how they represent a serious public health problem, and their relationship with risk factors individuals are exposed during life, especially children. The epidemiological data obtained in this study emphasize the importance of the diagnosis and control of intestinal parasites, especially in school-age children, representing a serious public health problem in Cape Verde.

Key-words: Enteroparasites; School-age children; Anaemia, Cape Verde

ÍNDICE

1.	Introdução	2
1.1.	Problemática e relevância do estudo.....	2
1.2.	Estado da Arte.....	4
1.2.1.	Enteroparasitoses	4
1.2.1.1.	Protozoários.....	4
1.2.1.2.	Helminthas	9
1.3.	Epidemiologia das Enteroparasitoses	12
1.4.	Patogenia das enteroparasitoses.....	16
1.5.	Diagnóstico laboratorial.....	19
1.5.1.	Diagnóstico molecular	20
1.6.	Tratamento das enteroparasitoses	21
1.7.	Epidemiologia molecular.....	22
1.8.	Anemia.....	24
1.9.	Objetivo do trabalho	25
1.9.1.	Objetivo Geral	25
1.9.2.	Objetivos Específicos	25
2.	Material e métodos	28
2.1.	Local de Estudo.....	28
2.1.1.	Localidade de Salina e a Escola Primária.....	31
2.2.	Desenho do Estudo.....	32
2.3.	Amostra.....	33
2.4.	Diagnóstico parasitológico.....	34
2.4.1.	Método de sedimentação difásica de Ritchie adaptado da versão (modificado e adaptado por Casemore et al 1985).....	34
2.4.2.	Exame microscópico após concentração das amostras.....	35

2.4.3. Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada (adaptado de Casemore et al, 1985).....	35
2.5. Diagnóstico molecular	36
2.5.1. Extração de DNA.....	36
2.5.2. Nested-PCR	37
2.5.3. Visualização dos produtos de PCR.....	43
2.5.4. Purificação dos produtos de PCR	44
2.6. Critérios de Inclusão e Exclusão	45
2.7. Aspectos éticos	45
2.8. Análise dos dados.....	45
2.9. Avaliação Nutricional	46
2.10. Diagnóstico da Anemia	46
3. Resultados	48
3.1. Caracterização demográfica	48
3.2. Diagnóstico parasitológicos e de biologia molecular.....	53
3.3. Fatores sociodemográficos e ambientais.....	60
3.4. Caracterização do estado nutricional das crianças	65
4. Discussão	70
4.1. Caracterização demográfica	70
4.2. Diagnóstico Parasitológico e de Biologia Molecular	71
4.3. Fatores Sociodemográficos e Ambientais.....	78
4.4. Caracterização do estado nutricional	80
5. Referências bibliográficas	86
ANEXO 1 – Questionário	112
ANEXO 2 – Termo de consentimento	114

ANEXO 3 – Curva de referência altura e Peso a para idade de meninos e meninas dos 2 aos 5 anos	115
ANEXO 4 – Parecer para a realização do estudo.....	117

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Idade das crianças do Jardim Infantil que participaram no estudo.....	49
Gráfico 2 – Idade das crianças da Escola Primária participantes no estudo.....	49
Gráfico 3 – Presença de enteroparasitas observada nos 433 participantes no estudo.....	53
Gráfico 4 – Frequência de enteroparasitoses nos alunos, professores e pessoal administrativo da Escola Primária de Salina	54
Gráfico 5 – Frequência de parasitas intestinais observada pelos métodos de diagnóstico utilizados (microscopia ótica e PCR).....	54
Gráfico 6 – Percentagem de parasitas encontrada nas amostras biológicas em estudo.	57
Gráfico 7 – Grau de escolaridade dos responsáveis pelas crianças parasitadas e não parasitadas	60
Gráfico 8 – Percentagem das crianças com e sem anemia no estudo	65
Gráfico 9 – Ocorrência de anemia entre as crianças não parasitadas, com um parasita e com poliparasitismo	68

Índice de Quadros

Quadro 1- Sequências nucleotídicas utilizados nas duas etapas da nested-PCR para amplificação do gene da β -giardina de <i>Giardia duodenalis</i> , com indicação do fragmento amplificado.....	38
Quadro 2- Condições utilizadas no processo de amplificação do DNA do gene da β -giardina de <i>Giardia duodenalis</i> por nested-PCR (adaptado de Cacciò et al., 2002 e Lalle et al., 2005).....	39
Quadro 3- Sequências nucleotídicas utilizados nas duas etapas da nested-PCR para amplificação do locus <i>SSU rRNA</i> de <i>Cryptosporidium</i> spp., com indicação do fragmento amplificado.....	40
Quadro 4- Condições utilizadas no processo de amplificação do DNA do locus <i>SSU rRNA</i> de <i>Cryptosporidium</i> spp. por nested-PCR (adaptado de Xiao et al., 1999).....	41
Quadro 5- Sequências nucleotídicas utilizados nas duas etapas da nested-PCR para amplificação do locus <i>ITS rRNA</i> do <i>Enterocytozoon bieneusi</i> , com indicação do fragmento amplificado.....	42
Quadro 6- Condições utilizadas no processo de amplificação do DNA do locus <i>ITS rRNA</i> de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> por nested-PCR.	42
Quadro 7 – Distribuição dos participantes quanto ao sexo de acordo com os grupos estudados	48
Quadro 8 – Frequência das variáveis clínicas, epidemiológicas e sociodemográficas de acordo com os grupos estudados	51
Quadro 9 – Situação de saneamento básico do ambiente dos grupos estudados	52
Quadro 10 – Frequência de parasitas identificados no estudo, de acordo com os grupos estudados	58

Quadro 11 – Sintomatologia apresentada pela população estudada na presença ou ausência de parasitas.....	59
Quadro 12 – Frequência de parasitas intestinais de acordo com os fatores sociodemográficos	62
Quadro 13- Ocorrência de Parasitas do Grupo dos Helmintas nos participantes que frequentavam a escola primária de Salina e relação com os fatores sociodemográficos em estudo.....	63
Quadro 14 – Ocorrência de Parasitas do grupo dos Protozoários nos participantes que frequentavam a escola primária de Salina e relação com os fatores sociodemográficos em estudo.....	64
Quadro 15 – Relação entre anemia, presença de parasitas, altura e peso para a idade nas crianças em idade escolar	66
Quadro 16 - Parasitas identificados no estudo, de acordo com a ocorrência de anemia nas crianças.....	67

Índice das figuras

Figura 1 - Fotografia de quisto de <i>E. histolitica</i> , em esfregaço fecal, corado por lugol. (×400)..	5
Figura 2 - Fotografia de quisto de <i>G. duodenalis</i> , em esfregaço fecal, corado por lugol. (×400)..	6
Figura 3 – Fotografia de oocistos de <i>C. parvum</i> corados por Ziehl-Neelsen modificado (x1000)..	7
Figura 4 - Fotografia de esporos de microsporidia, em esfregaço fecal, corado por Gram-Chromotrope. (×1000)..	8
Figura 5 - Forma vacuolar de <i>B. hominis</i> , corado com iodo.	9
Figura 6 - Fotografia de ovo de <i>H. nana</i> , em esfregaço fecal, corado por lugol. (×400)	10
Figura 7 - Fotografia de ovo de <i>A. lumbricoides</i> , em esfregaço fecal, corado por lugol. (×400)..	11
Figura 8 - Fotografia de ovo de <i>E. vermiculares</i> , em esfregaço fecal, corado por lugol. (×400)..	12
Figura 9 – Fotografia do gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene β -giardina de <i>G. duodenalis</i> por nested-PCR...	55
Figura 10 - Fotografia do gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene <i>SSU rRNA</i> de <i>Cryptosporidium spp.</i> por nested-PCR.....	55
Figura 11 - Fotografia do gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene <i>ITS rRNA</i> de <i>E. bienensi</i> por nested-PCR.....	56

Lista de abreviaturas, siglas, acrónimos e símbolos

% – Percentagem

% (m/v) – Percentagem massa/volume

°C – Grau Celsius

µl – Microlitro

µg – Micrograma

18S rRNA – Subunidade pequena do RNA ribossómico

A, C, G, T – Bases orgânicas constituintes dos nucleótidos (adenina, citosina, guanina e timina)

BSA – Albumina sérica bovina, do inglês bovine serum albumin

CNEPS – Comité Nacional de Ética em Pesquisa em Saúde

CDC – Centro de controlo e prevenção de doenças dos Estados Unidos da América, do inglês Centers for Disease Control and Prevention.

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês desoxiribonucleic acid

dNMP – Desoxirribonucleótido monofosfato

ddNTP – Didesoxirribonucleótido trifosfato

dNTP – Desoxirribonucleótido trifosfato

dsDNA – Ácido desoxirribonucleico em cadeia dupla, do inglês double strand DNA

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – Teste imunoenzimático específico, do inglês enzyme-linked immunosorbent assay

E.U.A. – Estados Unidos da América

et al. “E outros”, da locução latina *et alii*

FDA (do inglês “Food and Drug Administration”)

g – Grama

GP60 – Glicoproteína de 60-kDa

GPOOP – Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários

gdh – Gene que codifica para a glutamato desidrogenase

HCl – Ácido clorídrico

INE - Instituto Nacional de Estatística

ITS rRNA – Espaçadores internos transcritos, do inglês internal transcribed spacers,

km² - Quilómetros quadrado
 mg – Miligrama
 MgCl₂ – Cloreto de magnésio
 ml – Mililitro
 mM – Milimolar
 SSU rRNA – Subunidade pequena do RNA ribossómico, do inglês mitochondrial small subunit ribossomal RNA
 m/v - Massa/volume
 (NH₄)₂SO₄ – Sulfato de amónio
 NaClO₄ – Perclorato de sódio
 OMS – Organização Mundial de Saúde
 P – Probabilidade
 pb – Pares de base
 PBS – Tampão fosfato salino, do inglês phosphate buffered saline
 PCR – Reacção de polimerização em cadeia, do inglês polymerase chain reaction
 PDM – Plano Diretor Municipal
 pH – Simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniónica de uma solução (-log [H⁺])
 pmol – Picomole
 RNA – Ácido ribonucleico, do inglês ribonucleic acid
 rRNA – Ácido ribonucleico ribossómico, do inglês ribosomal ribonucleic acid
 rpm – Rotação por minuto
 Sida – Síndrome de imunodeficiência adquirida
 SPSS – Programa informático de análise estatística, do inglês statistical package for social sciences
 TAE – Tampão tris-acetato-EDTA
 TBE – Tampão tris-Borato-EDTA
 TE – Tampão tris-HCl-EDTA
 Tris-HCL – Tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorídrico
 tpi - Gene que codifica para a triose fosfato isomerase
 V – Volt
 VIH – Vírus da imunodeficiência humana

WHO – World Health Organization

χ^2 – Teste do Chi-quadrado

UNICEF – Fundo Das Nações Unidas Para a Infância, do inglês United Nations Children's Fund

UNU - Unit Nation Universal

UV – Ultravioleta

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Problemática e relevância do estudo

As enteroparasitoses estão entre as doenças infecciosas mais frequentemente encontradas em diferentes regiões do mundo, abrangendo um terço da população mundial (WHO, 2005).

As infecções parasitárias do aparelho digestivo constituem um problema grave de saúde pública (Chieffi & Amato Neto, 2003) e podem afetar o equilíbrio nutricional da população afetada, visto que interferem na absorção dos nutrientes, reduzindo a ingestão alimentar e, ainda, podem causar complicações significativas, como obstrução intestinal, prolapso rectal, hemorragia intestinal e formação de abscessos, em caso de superpopulação parasitária, podendo levar o doente à morte (Costa et al., 1999). As enteroparasitoses são ainda capazes de interferir negativamente no desenvolvimento físico e intelectual das crianças, o que contribui para o seu baixo rendimento escolar e, quanto aos adultos, baixa produtividade no trabalho, sendo um dos principais fatores debilitantes das populações (Neto, et al 2003; Quadros et al., 2004).

As condições de vida, habitação e saneamento básico são, em grande parte, determinantes da transmissão de tais parasitas. Alguns parasitas como *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Hymenolepis nana*, *Taenia solium*, *Ascaris lumbricóides*, *Trichuris trichiura* e *Enterobius vermicularis*, são transmitidos pela água ou alimentos contaminados. Outros, como *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Strongyloides stercoralis*, são transmitidos por larvas presentes no solo (Neves, 2005).

As enteroparasitoses humanas são consideradas um dos maiores problemas de saúde pública devido à sua ampla distribuição, alta taxa de prevalência e seus efeitos patogénicos, principalmente em populações das áreas tropicais e subtropicais (Mercado & Arias, 1995). O seu predomínio verificou-se na maioria dos países em desenvolvimento, devido às precárias condições sanitárias (WHO, 2006).

A morbidade relacionada com as parasitoses intestinais é um problema constante, uma vez que provoca alterações não só a nível nutricional, através da redução da absorção de nutrientes, como a vitamina A, interferindo muitas vezes na eficácia dos programas de suplementos vitamínicos, mas também no desenvolvimento físico e intelectual (Gilles, 2003).

O sistema imunológico das crianças está menos apto a reconhecer e combater agentes patogénicos. Além disso, a desnutrição, comum em populações de baixa renda, diminui a capacidade de resposta orgânica e a capacidade de resposta a tratamentos medicamentosos (Mamus, et al., 2008).

A malnutrição calórico-proteica e as infeções por parasitas intestinais são comuns em populações com baixo nível socioeconómico e com más condições de saneamento do meio (Mehraj, et al., 2008). Por outro lado, as infeções crónicas e intensas por parasitas intestinais podem contribuir para a desnutrição e anemia ferropénica afetando negativamente o crescimento físico e o desenvolvimento cognitivo na infância (Brooker, et al., 2006).

A alta taxa de anemia, principalmente nas crianças, tem sido correlacionada com a existência de alguns parasitas intestinais tendo fatores etiológicos complexos, incluindo dieta insuficiente em ferro, hemoglobinopatias, deficiência de micronutrientes (folato, riboflavina, vitamina A e B12) e infeções parasitárias (Midzi et al., 2010).

As crianças são mais vulneráveis do que os adultos à anemia por deficiência de ferro devido à sua maior necessidade de ferro durante os períodos de rápido crescimento, principalmente nos primeiros cinco anos de vida. Estima-se que 600 milhões de crianças em idade pré-escolar e escolar, do mundo inteiro, sejam anémicas e que, pelo menos, metade desses casos sejam atribuídos a deficiência de ferro. Esta situação ocorre com maior frequência entre a população infantil de países em desenvolvimento (WHO/CDC. 2008).

A biodiversidade de enteroparasitoses no meio escolar é um indicador da falta de informação da população sobre os hábitos higiénicos e condições propícias para a transmissão destes parasitas (Ferreira & Marçal 1997; Ludwig et al, 1999; Amendoeira et al, 2002).

A escola, só por si, não levará os alunos a adquirirem saúde. Entretanto, pode e deve fornecer informações/ensinamentos que capacitem os alunos e indiretamente os pais para uma vida saudável. Assim, tomando a escola como centralizadora dos estudos de saúde e educação, pode-se relatar os aspetos epidemiológicos das comunidades ao redor das mesmas, observando os possíveis fatores de risco pré-existentes na comunidade. A escola também poderá ser um centro privilegiado de debates e de informação para a população da sua área de cobertura, envolvendo as crianças como agentes promotores de mudança de práticas e multiplicadores de bons hábitos de saúde, no seio da família e da comunidade (Senna et al, 2001).

1.2. Estado da Arte

1.2.1. Enteroparasitoses

As enteroparasitoses são provocadas por parasitas, que habitam normalmente o intestino do hospedeiro, nos seus diferentes segmentos. Os parasitas intestinais estão divididos em dois grupos: Protozoários e Helminthas (Jernigan et al 1994).

1.2.1.1. Protozoários

Protozoários são organismos eucariotas unicelulares contendo um ou mais núcleos. Os protozoários que parasitam o intestino humano pertencem a cinco grupos distintos: amebas, flagelados, ciliados, coccídeos e microsporídeos. Tais espécies variam quanto à prevalência e patogenicidade, sendo alguns patogénicos e outros não. Os protozoários intestinais têm ciclos de vida relativamente simples (DeCarli, 2001) e apresentam duas formas distintas, o quisto que é a forma de resistência no ambiente e o trofozoíto que é a forma vegetativa.

Segundo Neves (2005), os protozoários intestinais mais frequentes são as amebas: *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba díspar*. *Entamoeba histolytica* é a única espécie da família Endamoebidae considerada patogénica, e causa a doença designada amebíase. A presença das outras amebas, consideradas comensais, no intestino do homem, apesar de não ter repercussões clínicas, indica a ingestão de alimentos sólidos ou líquidos contaminados com fezes e falta de higiene (DeCarli, 2001).

***Entamoeba histolytica*:** É uma das formas mais primitivas de protozoário, sendo extremamente frágil, pleomórfica e sensível às mudanças de temperatura (Martinez, 1988). Pertence a um grupo de amebas, da família Entamoebidae, que são parasitas comuns da espécie humana. Integra o grupo das Entamoebas, ou amebas interiores. O seu ciclo de vida é monoxénico, ou seja, completa o seu ciclo de vida em apenas um hospedeiro e apresenta dois estádios básicos e bem definidos: trofozoítos e quistos. O quisto, eliminado através das fezes, é capaz de resistir às condições desfavoráveis do ambiente externo, podendo, desse modo, infetar outro indivíduo que se torna um novo hospedeiro. O trofozoíto é a forma de reprodução e causa doença no hospedeiro (Ravdin, 1988). O mecanismo de transmissão ocorre através da ingestão de quistos maduros, com alimentos (sólidos ou líquidos). O consumo de água sem tratamento, contaminada por dejetos humanos, é um modo frequente

de contaminação, enquanto a ingestão de alimentos contaminados (verduras cruas - alface, agrião; frutas - morango) é outro possível meio de transmissão dos quistos de protozoários intestinais (Neves, 2005).



Figura 1 - Fotografia de quisto de *E. histolítica*, em esfregaço fecal, corado por lugol. (×400). Original da autora.

Várias espécies de flagelados habitam o aparelho intestinal humano, dessas espécies somente *G. duodenalis* é considerada patogénica para o homem, agente etiológico da giardíase. A maioria das espécies vivas dos flagelados é piriforme, elipsóide ou oval e, algumas vezes, esférica, possuindo flagelos cujo número e disposição varia segundo as espécies (DeCarli, 2001).

***Giardia duodenalis, lamblia ou intestinalis*:** é um dos protozoários flagelados que apresenta um ciclo de vida monoxénico, constituído por dois estádios, o quisto, forma resistente ao ambiente externo e infecciosa, é responsável pela propagação da infeção e consegue sobreviver por longos períodos em ambiente adequado, fora do hospedeiro, sendo resistentes ao cloro, e o trofozoíto que constitui a forma vegetativa e é responsável por causar doença no hospedeiro através da aderência à mucosa duodenal e do jejuno proximal, não sendo invasivo. O trofozoíto multiplica-se por divisão binária e coloniza o intestino. Durante períodos de diarreia os trofozoítos podem ser excretados nas fezes (Adam, 2001; Farthing, et.al., 2009; John, 2011). A infeção ocorre pela ingestão de quistos por via fecal-oral e pode causar diarreia autolimitada, crónica, síndrome de má absorção, gás ou flatulência, perda de

peso e desidratação. No entanto em alguns indivíduos, esta infecção pode ser assintomática, permanecendo assim o protozoário no intestino do hospedeiro por um período mais ou menos prolongado (Neves, 2005).

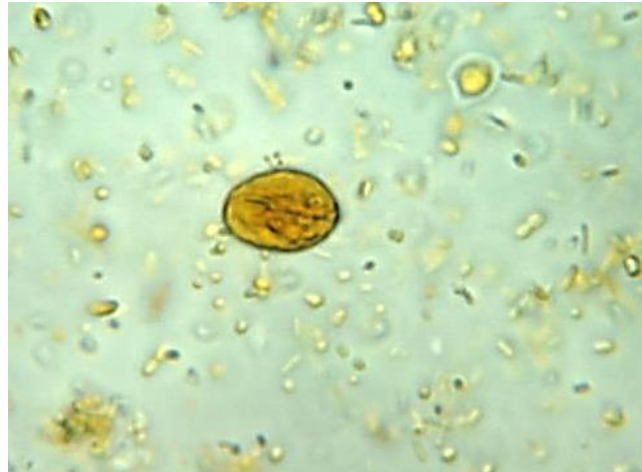


Figura 2 - Fotografia de quisto de *G. duodenalis*, em esfregaço fecal, corado por lugol. (×400). Original da autora.

Os apicomplexa intestinais pertencem aos gêneros *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Cystoisospora* e *Sarcocystis* são parasitas intracelulares obrigatórios, vivem e reproduzem-se dentro de uma célula animal, habitam a mucosa do intestino delgado do homem. Os gêneros *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e *Cystoisospora* constituem grupos de protozoários parasitas, responsáveis por gastroenterite transitória (Garcia & Shimizu, 1993; Fayer, 2010).

***Cryptosporidium* spp.:** são parasitas entéricos e desenvolvem-se no epitélio da mucosa intestinal ou gástrica de diversos vertebrados. O ciclo de vida é monoxênico com três fases de desenvolvimento no organismo hospedeiro: merogonia, gametogonia e esporogonia. Os oocistos possuem internamente quatro esporozoítos (Neves, 2005). Durante o ciclo de vida formam-se duas categorias de oocistos: oocisto de parede espessa, eliminados para o ambiente exterior já esporulados, através das fezes, e resistentes às condições ambientais, sendo responsável pela transmissão do parasita para outros animais; e oocisto de parede fina, os quais rompem no intestino do hospedeiro e libertam esporozoítos que vão invadir novas células do epitélio intestinal não infectadas, designando-se a esta ação autoinfecção (Xiao et al. 2004). A criptosporidiose é uma antropozoonose que causa problemas sérios e prolongados em imunodeficientes, nomeadamente em doentes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (sida) causando infecção que resulta numa doença

diarreica auto-limitada que dura 1-2 semanas. As manifestações da criptosporidiose podem ser agrupadas em dois tipos, dependendo do estado imunitário do portador: gastroenterite transitória em imunocompetentes, e manifestações persistentes, com sinais e sintomas clínicos marcados em doentes imunodeprimidos (Garcia & Shimizu, 1993). A infecção humana ocorre por via fecal-oral através da ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos (forma infetante) (Fayer *et al.*, 2000; Dillingham *et al.*, 2002). De entre as 27 novas espécies descritas após as descobertas por Tyzzer, 14 foram encontradas no homem. As espécies *Cryptosporidium hominis* e *Cryptosporidium parvum*, são as mais prevalentes no homem (Ryan *et al.*, 2014; Ryan & Hijjiawi, 2015).

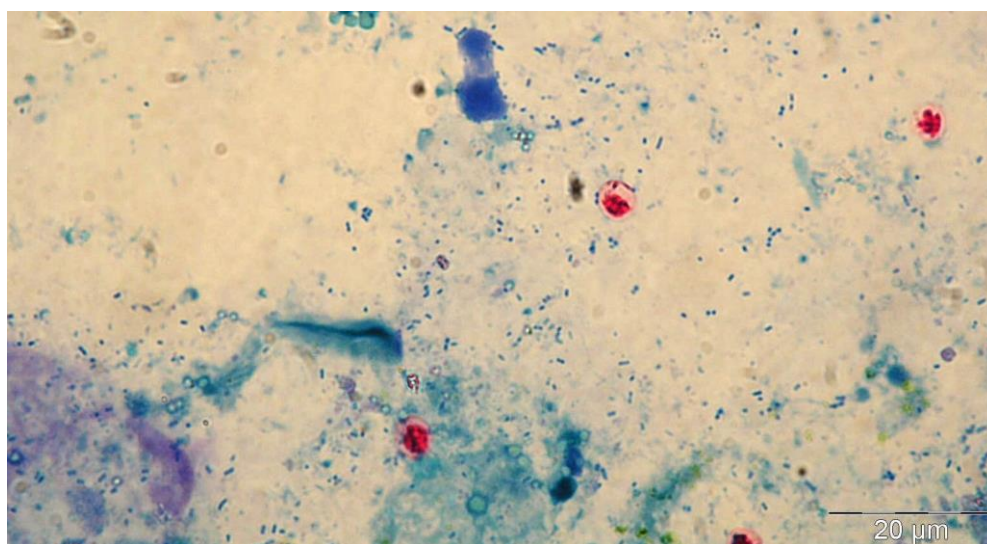


Figura 3 – Fotografia de oocistos de *C. parvum* corados por Ziehl-Neelsen modificado (x1000). Fonte: Vieira, 2012.

Os **Microsporídeos** são organismos produtores de esporos intracelulares obrigatórios, com mais de 1000 espécies das quais 14 são conhecidas por infetar seres humanos e somente duas causam doenças intestinais em seres humanos: *Enterocytozoon bieneusi* e *Encephalitozoon intestinalis* (Didier, 2005). As infecções causadas por *E. bieneusi* e *E. intestinalis* têm sido frequentemente relatadas como causa da diarreia crónica em pessoas com sida e de diarreia aguda em pessoas imunocompetentes (Morales *et al.*, 1995, Wanke *et al.*, 1996, Gainzarain *et al.*, 1998, Raynaud *et al.*, 1998, Velez *et al.*, 1999, Muller *et al.*, 2001, Lores *et al.*, 2002, Leelayoova *et al.*, 2005, Mungthin *et al.*, 2005, Wichro *et al.*, 2005).

Enterocytozoon bieneusi: o seu ciclo de vida é monoxénico envolve um estágio merogónico proliferativo, seguido por um estágio esporogónico, que resulta na formação dos esporos (Weber et al., 1994), a infeção ocorre pela via fecal-oral através do consumo de água e/ou alimentos contaminados por esporos (Didier et al., 2005). A infeção pode acontecer tanto em imunocompetentes como em imunocomprometidos, sendo que nos imunocomprometidos ela é mais grave e, no grupo dos imunocompetentes, as crianças são as mais afetadas sendo o quadro clínico variável dependendo da idade e da saúde da criança (Desportes et al., 1985; Didier et al., 1998; Didier, 2005; Thellier & Breton, 2008).

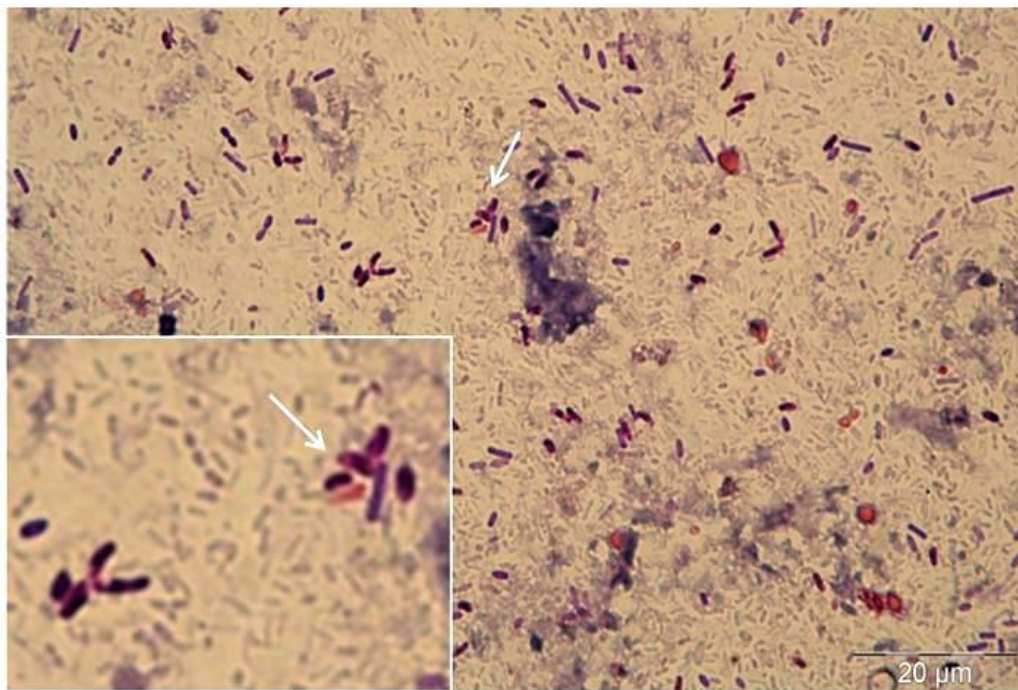


Figura 4 - Fotografia de esporos de microsporidia, em esfregaço fecal, corado por Gram-Chromotrope. (×1000). Fonte: Lobo, 2010.

Blastocystis hominis: é um organismo pleomórfico, classificado segundo DeCarli, (2001) em três formas morfológicas: vacuolar, granular e amebóide. Possui quistos com parede fina, e quistos com parede espessa. Provavelmente, os quistos com parede fina são auto infetantes, ou seja, multiplicam-se no trato intestinal e os de parede espessa promovem a transmissão externa através da via fecal-oral (Albrecht et al., 1995).

O blastocisto é um protozoário com taxonomia e patogenia ainda incertas. Algumas pessoas infetadas apresentam diarreia, cólicas, náuseas, febre, vômitos e dor abdominal, porém em muitos desses casos existe associação com outros agentes patogénicos como

bactérias, vírus ou outros protozoários potencialmente patogênicos (Fauci et al., 1998). Estudos sugerem que a infecção sintomática por *B. hominis* que responde à terapia, representa provavelmente a eliminação conjunta de outros organismos patogênicos não detectados, como *E. histolytica* ou *G. lamblia* (Albrecht et al.,1995). Quando este microrganismo está presente em grande quantidade e, na ausência de outros parasitas, bactérias ou vírus, pode ser a causa desses sintomas e a terapia pode ser necessária. Em doentes com associação de outros agentes patogênicos, os sintomas podem ser mais proeminentes. No entanto, como ainda existe controvérsia em relação à sua patogenicidade, devem ser estimulados mais estudos sobre o assunto (Albrecht et al.,1995).



Figura 5 - Forma vacuolar de *B. hominis*, corado com iodo. Fonte: CDC, 2017

1.2.1.2. Helminthas

Os helmintas são organismos pluricelulares e apresentam um ciclo de vida mais complexo que os protozoários (Jernigan et al 1994). Os helmintas que parasitam o intestino humano estão distribuídos pelos filos Platyhelminthes e Nematoda. Do filo Platyhelminthes os mais frequentes são *Taenia solium* e *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana* e *Hymenolepis diminuta*. Do filo Nematoda os mais frequentes são o *Ascaris lumbricóides*, o *Enterobius vermicularis*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura* e *Strongyloides stercoralis* (Neves, 2005).

***Hymenolepis nana*:** pertence à família Hymenolepididae, é o menor e mais comum cestode que ocorre nos homens, e pode apresentar dois tipos de ciclo: um monoxénico, em

que prescinde de hospedeiro intermediário, e outro heteroxénico, tendo insetos (pulgas) como hospedeiros intermediários (Chiodini et al., 2001). O mecanismo mais frequente de transmissão é através da ingestão de ovos presentes nas mãos ou em água e alimentos contaminados. Normalmente nestes casos ocorrem poucas reinfeções no hospedeiro, pois a larva cisticercóide, tendo-se desenvolvido nas vilosidades da mucosa intestinal, confere forte imunidade ao doente (Bienz, 2004).

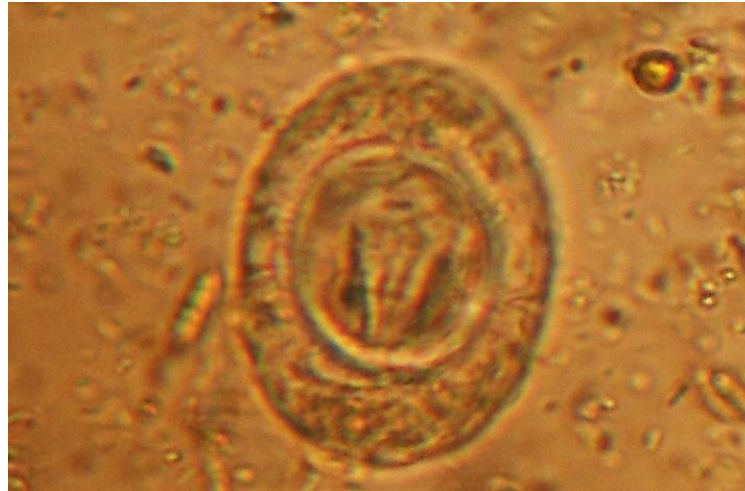


Figura 6 - Fotografia de ovo de *H. nana*, em esfregaço fecal, corado por lugol. (×400). Original da autora.

Ascaris lumbricoides: pertence à família Ascarididae, o homem é a única fonte de infecção que se conhece, sendo as crianças em idade escolar e pré-escolar a faixa etária da população mais afetada (Gryschek & Lescano, 2008). A transmissão acontece por via fecal-oral através do contacto da água ou alimentos com ovos do parasita, que são dispersos no ambiente pelas chuvas, ventos, insetos, aves e batráquios insectívoros e contaminam o solo e fontes de água. (Nyarango, et al., 2008; Gryschek & Lescano, 2008; Brooker & Bundy, 2009). A infecção ocorre por ingestão de ovos embrionados (O’Lorcain & Holland, 2000)

que eclodem no intestino delgado do hospedeiro e libertam uma larva rabditoide (Brooker & Bundy, 2009).

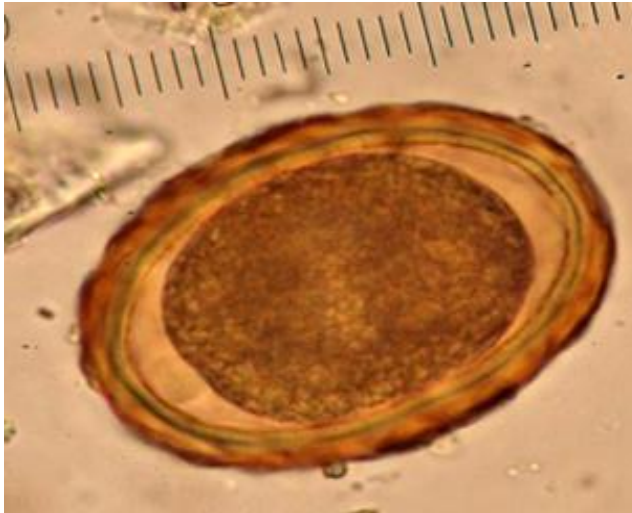


Figura 7 - Fotografia de ovo de *A. lumbricoides*, em esfregaço fecal, corado por lugol. (×400). Original da autora.

Enterobius vermicularis: pertence à família Oxyuridae tem distribuição geográfica mundial, com maior incidência nas regiões de clima temperado. (Llop *et al.*, 2001). O ciclo de vida é monoxénico; após a cópula, os machos são eliminados juntamente com as fezes e morrem. As fêmeas, cheias de ovos, libertam-se do cego e dirigem-se para o ânus principalmente à noite, para fazer a oviposição na região perianal (Neves, 2005).



Figura 8 - Fotografia de ovo de *E. vermicularis*, em esfregaço fecal, corado por lugol. (×400). Original da autora.

1.3. Epidemiologia das Enteroparasitoses

As enteroparasitoses humanas são consideradas um dos maiores problemas de saúde pública devido à sua ampla distribuição, alta taxa de prevalência e efeitos patogênicos, principalmente nas populações das áreas tropicais e subtropicais (Mercado & Arias, 1995). O seu predomínio ainda continua na maioria dos países em desenvolvimento, devido às precárias condições sanitárias (WHO, 2006).

As enteroparasitoses são um dos principais fatores debilitantes das populações, associando-se frequentemente a quadros de diarreia crônica e de desnutrição, comprometendo o desenvolvimento físico e intelectual, particularmente das faixas etárias mais jovens da população (Uecker et al., 2007).

Diversas pesquisas sobre a prevalência de enteroparasitoses têm sido realizadas em todo o mundo apresentando diferentes taxas nas diversas regiões.

Nos últimos anos, vários países melhoraram o seu nível socioeconômico e, mesmo assim, observou-se alta prevalência de enteroparasitoses nesses países (Machado et al., 1999). Segundo esses autores essa alta prevalência engloba os mais diversos fatores relacionados direta ou indiretamente com a transmissão das enteroparasitoses tais como: maus hábitos de higiene, alimentos contaminados, saneamento do meio, situação

socioeconómica, solos contaminados, moscas e outros insetos sinantrópicos (com capacidade de adaptações às alterações do ambiente natural), o próprio ar e especialmente a veiculação hídrica.

A doença diarreica, causada por enteroparasitas, continua a ser responsável por alta taxa de mortalidade nos países em desenvolvimento, sendo a causa de aproximadamente 21% da mortalidade infantil nos primeiros cinco anos de vida. Os enteroparasitas causam cerca de 2.5 milhões de mortes/ano, sendo também das principais causas de hospitalização e morbidade em todo o mundo (Mandomando et al., 2007). Dos viajantes que se deslocam a países em desenvolvimento tropicais e subtropicais, cerca de 25 a 50% destes experimentam episódios diarreicos, sendo os protozoários a causa mais comum para a diarreia crónica (Ek Dahl & Andersson, 2005).

As espécies *E. histolytica*, *G. duodenalis*, e *Cryptosporidium* spp são os principais protozoários responsáveis por doenças diarreicas em todo mundo, particularmente em crianças (Mukherjee et al., 2009).

A **disenteria amebiana** provocada por *E. histolytica* ocorre mundialmente, sendo que a maior incidência verifica-se nas regiões tropicais e subtropicais. Mais de 500 milhões de pessoas são infetadas, ocorrendo entre 40 000 a 100 000 mortes anualmente, em resultado do desenvolvimento da forma invasiva da doença. Estes valores fazem com que a amebíase seja considerada como a terceira causa de morte provocada por doenças parasitárias (Tanyuksel & Petri, 2003).

A infeção amebiana é predominante na Índia, África, áreas da América Central e do Sul e Extremo Oriente. Nos países em desenvolvimento a sua distribuição e prevalência dependem em grande parte dos hábitos culturais, da idade, do nível de saneamento, da aglomeração populacional e do nível socioeconómico. Já nos países desenvolvidos, a infeção é principalmente de vida a *E. díspar* (espécie considerada comensal) e é confinada a determinados grupos: imigrantes ou viajantes para áreas endémicas, homens homossexuais, doentes infetados com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) e a pessoas idosas ou com doenças mentais institucionalizadas em asilos (Ali et al, 2008).

A situação epidemiológica da amebíase mudou completamente desde a separação das espécies de *Entamoeba*: *E. histolítica* e *E. díspar*. Estudos realizados em diversas regiões do mundo revelaram prevalências variáveis da doença. Na África do Sul e no Egito a prevalência é maior que 20% (Stauffer et al., 2006), na Turquia é de 13% (Tanyuksel et al., 2005) e no Irão é de 7,9% (Hooshyar et al., 2004), e na Nicarágua 1,5%, (Leiva et al., 2006).

No Vietname, na cidade de Hue, a incidência é de cerca de 21 novos casos de amebíase hepática por cada 100.000 habitantes por ano (Blessmann et al., 2002). A amebíase é a quinta doença mais prevalente na população mexicana, sendo considerada um importante problema de saúde pública (Ximénez, 2006). No Bangladesh, a prevalência da amebíase varia de 1% a 4,3% em crianças dependendo do local – área urbana ou rural (Haque et al., 1997, 2001). No entanto, em países da Europa como a Grécia, não parece ser um problema relevante (Evangelopoulos et al., 2001).

A ameba, *Entamoeba coli*, considerada comensal, é a ameba encontrada nas fezes com mais frequência e é de distribuição cosmopolita, apresenta distribuição geográfica ampla e apesar de não ser citada como patogênica para o homem, quando identificada nos exames parasitológicos de fezes pode indicar falta de medidas de higiene, principalmente com água e alimentos contaminados ingeridos pelas populações ou pessoas individuais em estudo (Neto, et al 2003; Rey, 2002).

A **giardíase** encontra-se distribuída mundialmente, mas com alta prevalência nos países em desenvolvimento, onde as taxas de prevalência podem alcançar os 20% a 60%, enquanto nos países industrializados varia entre 2% e 7% (Thompson et al., 1990). A prevalência da infecção é mais elevada na infância e durante a idade pré-escolar e sofre um decréscimo na adolescência. A idade é um fator de risco para a suscetibilidade à giardíase que apesar de surgir com frequência na idade infantil, é rara em crianças até 6 meses de idade, particularmente quando é praticada a amamentação. A subnutrição poderá aumentar a suscetibilidade para a infecção por *G. duodenalis*, como indica um estudo realizado em crianças da Gâmbia com diarreia crônica e malnutrição, em que 45% das crianças tinham giardíase (Cook & Zumla, 2009).

Nos países em desenvolvimento é muito comum ocorrerem infecções por *G. duodenalis*, uma das principais causas de diarreia nesses países. Os indivíduos infetados podem ser assintomáticos, ou apresentarem síndrome de má absorção, com diarreia aguda ou persistente, associada a cólicas e intensa formação de gases (Neves, 2005).

Indivíduos desnutridos e imunocomprometidos apresentam maior facilidade de desenvolver a giardíase e ter persistência da infecção porque as barreiras de proteção do hospedeiro, como a acidez gástrica, estão diminuídas no desnutrido, interferindo no desenvolvimento dessa parasitose (Sullivan et al., 1990). Como os parasitas tendem a aderir ao revestimento da mucosa intestinal, a infecção pode ser difícil de diagnosticar, sendo muitas vezes necessário vários exames de fezes para se obter um resultado fiável (Solomons, 1993).

A **criptosporidiose** é uma doença ubiqüitária, descrita mundialmente em mais de 40 países distribuídos pelos seis continentes e pode ser encontrada tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, sendo relatados anualmente 250 a 500 milhões de infecções causadas por *Cryptosporidium* spp. na Ásia, África e América Latina (Current & Garcia, 1991; Smith e Rose 1998; Fayer et al., 2000; Kosek et al., 2001; Waldron et al., 2011).

Os fatores que influenciam a epidemiologia desta protozoose são vários: tamanho pequeno do oocisto, dose baixa infetante, oocistos esporulados e infecciosos imediatamente após a sua eliminação com as fezes, possibilidade de ser transmitido pessoa-a-pessoa, os oocistos são altamente resistentes no ambiente e dispersam-se por via hídrica, através dos alimentos ou ainda pelo ar. A transmissão direta (contacto com pessoas infetadas ou animais infetados) ou indireta (ingestão de água contaminada, ingestão de alimentos contaminados, inalação dos oocistos) é favorecida por densidades populacionais altas (Cacciò et al., 2005).

Num estudo em crianças africanas do Uganda, que apresentavam diarreia persistente, detetou-se prevalência de *Cryptosporidium* spp. de 31,3%. Entre as crianças seropositivas para VIH, a taxa foi de 73,6% (Tumwine et al., 2005). No Gana, um estudo mostra uma prevalência de *Cryptosporidium* spp. de 27,8% e 15,6% em crianças com e sem diarreia, respetivamente (Adjei et al., 2004). Ungar et al. (1988), afirmaram que a prevalência da criptosporidiose em crianças dos países latino-americanos variava entre 2 e 31%. Na Jamaica uma pesquisa feita por Lindo e colaboradores em 1998 demonstrou uma prevalência de *Cryptosporidium* spp. de cerca de 4%, sobretudo em crianças, e na comunidade Aymara, no altiplano norte da Bolívia, registrou-se uma prevalência de *Cryptosporidium* spp. nas crianças de 31,6% (Esteban et al. 1998). Ainda, na Venezuela, em dois vilarejos ameríndios no oeste do país, um estudo determinou uma prevalência global de *Cryptosporidium* spp. de 8,8% (Chacín & Sánchez, 2000), e no Peru, Xiao et al. (2001) encontraram uma prevalência de *Cryptosporidium* spp. de 21% em crianças de uma comunidade urbana de baixa renda. No México, um estudo em três comunidades de Chihuahua, foi encontrada prevalência global de 70,4% de *Cryptosporidium* spp. (Redlinger et al., 2002). Nestas comunidades não havia serviço municipal de saneamento e a maioria da população não tinha água canalizada em suas casas. Na Guatemala, uma pesquisa feita em crianças de duas comunidades ao redor do Lago Atitlan mostrou uma prevalência de 32% de *Cryptosporidium* spp. (Laubach et al., 2004).

Os **helmintas intestinais** encontram-se distribuídos por todo o globo, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais (Morenikeji et al, 2009). Com particular interesse destacam-se os geohelmintas (helmintas do solo), que são o grupo de parasitas mais prevalentes em infecções por helmintas nos humanos, sendo calculada infecção em cerca de 2 bilhões de pessoas, em especial nos países em desenvolvimento (Cooper et al, 2008). As crianças são o grupo com as maiores taxas de prevalência e intensidades de infecção, sendo também muito vulneráveis aos efeitos destes parasitas. Estes efeitos incluem deficiências nutricionais e comprometimento do desenvolvimento físico e mental, resultando em problemas de saúde adicionais (Saathoff et al., 2004). Estes geohelmintas são mais frequentes em crianças que vivem em más condições de saneamento, e o seu impacto na morbidade e mortalidade é mais grave em crianças desnutridas. Estudos sugerem que aproximadamente 70% destes parasitas infetam cerca de 15% da população humana (Mascarini et al., 2010).

Rey (2002) e Neves (2005), afirmam que o parasitismo por *Hymenolepis nana* é cosmopolita, encontrando-se com maior frequência em regiões de clima temperado ou subtropical do sul da Europa, norte da África, vários países do médio oriente, Índia e América Latina, onde as práticas de higiene e os meios sanitários são insuficientes ou deficientes. Na China, por exemplo, estudos relatam que a taxa de prevalência de enteroparasitas chega a 48,5% para *Ascaris lumbricoides* e a 20% para *Trichuris trichiura* em estudantes de escolas primárias (Long et al., 1995).

1.4. Patogenia das enteroparasitoses

A adesão das amebas da espécie *E. histolytica* às células-alvo é a primeira etapa do processo que levará a erosão do epitélio da mucosa intestinal. As amebas invasivas desencadeiam um processo de citólise. Nas áreas de erosão epitelial inicia-se a invasão das amebas, preferencialmente pelo epitélio interglandular. Na sua passagem para as camadas internas da mucosa intestinal, as amebas lizam células e degradam componentes da matriz extracelular. Ao entrar na circulação sanguínea, as amebas podem chegar ao fígado, pulmões, cérebro, e formar nesses locais abscessos amebianos necróticos (Neves, 2005). Só o ciclo no intestino produz quisto, que sendo eliminados com as fezes, mesmos nos casos assintomáticos, podem propagar a infecção (Rey, 2002). *Entamoeba histolytica* causa amebíase invasiva intestinal com disenteria, colite, apendicite, megacólon, peritonite,

abscesso hepático, abscesso pleuropulmonar, lesões oculares e genitais. A amebíase hepática é a forma invasiva que causa maior número de mortes, cujo percentual varia nos diferentes estudos (Shamsuzzaman, 2000). Uma vez invadida a mucosa, os trofozoítos multiplicam-se e prosseguem penetrando nos tecidos sob a forma de microulcerações, com escassa reação inflamatória. Na submucosa, as amebas podem progredir em todas as direções, determinando inicialmente a ulceração típica. As lesões amebianas são mais frequentes no cego e na região retossigmoideia. As úlceras variam muito em tamanho e forma e podem estender-se a grandes proporções do intestino grosso (Neves, 2005).

O parasitismo por *G. duodenalis* é em geral assintomático, mas também pode estar relacionado com quadros clínicos de diarreia aguda ou com formas crônicas de diarreia e má absorção intestinal (Rey, 2002). A giardíase promove atrofia das vilosidades e das microvilosidades intestinais resultando em má digestão e absorção (síndrome da má-absorção e digestão). O parasitismo é maior na porção anterior do intestino delgado (Hawrelak, 2003). Quando um novo hospedeiro ingere um quisto de *G. duodenalis*, o ambiente ácido do estômago estimula o desenquistamento e cada quisto produz dois trofozoítos. Estes trofozoítos migram para o duodeno e jejuno proximal, onde se fixam aos enterócitos da mucosa intestinal provocando lesão nas microvilosidades, o que interfere com a absorção de nutrientes. A rápida multiplicação dos trofozoítos pode criar uma barreira física entre os enterócitos e o conteúdo intestinal, interferindo com a absorção de nutrientes. Este processo leva à atrofia das microvilosidades, hiperplasia das criptas, hiperpermeabilidade intestinal, danos estes associados a redução na secreção de enzimas dissacaridases, importantes no processo de digestão. Os trofozoítos geralmente não penetram o epitélio nem invadem os tecidos circundantes, ou entram na corrente sanguínea. Assim, a infecção é geralmente contida no lúmen intestinal (Eckmann e Gillin, 2001; Hawrelak, 2003). Entretanto, tem-se procurado uma explicação para a possível interferência na absorção de gorduras pela mucosa intestinal, quando o número de parasitas forrando a superfície duodenal e jejunal é muito grande. Há também indícios sugerindo a produção de uma toxina pelas giardias. O alto teor de gorduras que permanece no lúmen intestinal causaria então uma síndrome diarreica persistente. Sabe-se que há má absorção intestinal, mas não se sabe exatamente que mecanismo a produz (Rey, 2002).

A doença causada por *Cryptosporidium* spp., designada criptosporidiose, é uma das infecções entéricas mais comuns nos países desenvolvidos e em desenvolvimento e acontece em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos. A característica clínica mais

evidente desta patologia é a diarreia. A infecção num indivíduo imunocompetente pode ser assintomática ou sintomática, e apresentando neste último caso, evolução aguda e acompanhada de diversas manifestações gastroenterológicas (Okhuysen et al., 1999; Chen et al., 2002). Normalmente, a diarreia é profusa e aquosa, podendo conter muco, mas raramente sangue e leucócitos, e está muitas vezes associada a perda de peso. Outros sintomas menos comuns incluem dor abdominal, náuseas, vômitos e febre baixa. Ocasionalmente podem surgir mialgias, astenia, mal-estar, cefaleias e anorexia. A duração e gravidade desses sintomas dependem de diversos fatores, sendo o mais importante o estado imunológico do hospedeiro (Current & Garcia, 1991). A criptosporidiose em doentes imunocomprometidos, nomeadamente com sida, ou sujeitos a quimioterapia, transplantados ou com alterações hematológicas, produz um quadro clínico com algumas diferenças relativamente à população imunocompetente, no que se refere à gravidade e cronicidade da diarreia, assim como à localização extraintestinal da infecção (Gentile et al., 1997; Hunter & Nichols, 2002; Chalmers & Davies, 2010). Nas crianças, a criptosporidiose constitui uma das principais causas de diarreia, particularmente nos países em desenvolvimento nos quais a doença é endémica (Newman et al., 1994), surgindo com maior frequência em crianças com menos de dois anos de idade (Chalmers & Davies, 2010)

A patogenia da himenolepíase (causado por *H. nana*), relaciona-se diretamente com a imunidade desenvolvida tanto pelas larvas cisticercóides como pelos vermes adultos durante a sua permanência no indivíduo parasitado, impedindo a fixação das oncosferas na mucosa ileal e destruindo algumas larvas que iniciaram o seu desenvolvimento. Esses factos justificam que grande número das infecções sejam assintomáticas (Melo et al., 2004). As infecções humanas por *H. nana* não são usualmente acompanhadas por manifestações clínicas. O aparecimento de perturbações está associado à idade do doente e ao número de vermes hospedados. Os sintomas atribuídos às crianças são: agitação, insónia, irritabilidade, diarreia, dor abdominal, raramente ocorrendo sintomas nervosos, dos quais os mais difíceis de suportar são ataques epiléticos. As alterações nervosas talvez se devam a uma excitação do córtex, por ação reflexa ou por libertação de toxinas. Na sintomatologia anteriormente referida, devido a hiperinfecção, ainda se pode notar congestão da mucosa, infiltração linfocitária, ulcerações pequenas, eosinofilia e perda de peso (Rey, 2002).

Dependendo da carga parasitária e das condições do hospedeiro, estado nutricional, imunológico, idade, hábitos de geofagia, etc., os indivíduos infetados por *A. lumbricoides* podem ser assintomáticos ou sintomáticos (Gryschek & Lescano, 2008). Nos casos

sintomáticos, as manifestações mais frequentes são: desconforto abdominal, dor epigástrica, cólicas intermitentes e má digestão, bem como náuseas, anorexia e emagrecimento (Rey, 2008). Na fase de migração larvar pode haver envolvimento pulmonar, que se manifesta pela síndrome de Löffler (pneumonite transitória aguda, febre e eosinofilia), o que pode ocorrer semanas antes da sintomatologia gastrointestinal (Fernandes et al., 2011). Dentre os sintomas mais frequentes em crianças com hiperinfecção, destacam-se irritabilidade, insônia, inquietação, perda de peso, anorexia, manifestações gastrointestinais e prurido. Com menor frequência, ocorrem manifestações nervosas, caracterizadas por ataques epileptiformes, com perda de consciência e convulsões, sintomas estes, que regredem após a eliminação espontânea do parasita (reação imunológica) ou por ação de vermícidias (Neves, 2005).

1.5. Diagnóstico laboratorial

O exame de fezes constitui a forma clássica de diagnóstico laboratorial das parasitoses intestinais. Segundo Walsh (1986) o diagnóstico laboratorial para a maioria dos parasitas intestinais é preferencialmente pelo exame microscópico, o que permite a visualização de quisto e/ou trofozoitos, oocistos e esporos (Protozoários) e ovos e/ou larvas (Helmintas).

Os métodos de diagnóstico para a criptosporidiose utilizados atualmente dependem fortemente da identificação dos oocistos nas fezes, embora o parasita seja frequentemente detetado em cortes histológicos de biópsias intestinais. Três métodos de coloração são de uso comum: coloração auramina, coloração Ziehl-Neelsen modificada e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais contra oocistos. Estas técnicas são pouco sensíveis (Weber et al., 1991).

No diagnóstico laboratorial das enteroparasitoses, para além dos métodos parasitológicos podemos considerar os métodos sero imunológicos, os quais baseiam-se na demonstração da presença do parasita, por vias indiretas, através da pesquisa de anticorpos anti-parasita. Estes métodos são utilizados essencialmente nas parasitoses invasivas. Dentre as diferentes metodologias serológicas amplamente difundidas, pode-se citar a reação de imunofluorescência (direta e indireta) e as técnicas de ELISA e Western-blot, que permitem, na maioria dos casos, um diagnóstico preciso, não-invasivo, apresentando valores expressivos de sensibilidade e especificidade (Grisard & Steindel, 2001).

Embora as técnicas de microscopia e imunologia possam ser usadas para diagnosticar as enteroparasitoses, estas podem não ser sensíveis o suficiente, pois falham na identificação/deteção quando se está perante amostras biológicas com número baixo de quistos e/ou oocistos eliminados pelos hospedeiros, além de não permitirem a diferenciação dos genótipos dos protozoários. Devido a estas limitações foram desenvolvidas técnicas de biologia molecular, nomeadamente a técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR) para deteção e caracterização genótipica de vários protozoários intestinais (Nantavisai et al., 2007).

Aliado à especificidade dos métodos parasitológicos e o princípio dos métodos serológicos, pesquisa de anticorpos antiparasita, a sensibilidade dos métodos de diagnóstico molecular é mais significativa quando estes métodos são utilizados em conjunto com aqueles métodos.

1.5.1. Diagnóstico molecular

A falta de métodos específicos e sensíveis no diagnóstico das diferentes doenças parasitárias humanas tem sido um grande desafio para a comunidade científica. A procura por métodos capazes de revelar com precisão uma infeção, em qualquer uma das diferentes fases da vida de um parasita, tem levado inúmeros grupos de investigação a desenvolver e/ou a melhorar técnicas parasitológicas, sero imunológicas e moleculares para esse fim (Grisard & Steindel, 2001).

Com o aparecimento das tecnologias de análise de ácidos nucleicos para a deteção e caracterização dos parasitas os resultados obtidos têm sido promissores. As técnicas tornaram-se reprodutíveis, muito sensíveis e de alta especificidade. Atualmente utilizam-se varias técnicas de biologia molecular para deteção, caracterização e diferenciação específica de diferentes parasitas (Grisard et al., 1999)

Dentre todos estes métodos e suas variantes, neste estudo destaca-se a PCR mais precisamente a *nested*-PCR.

A PCR é uma técnica de extrema sensibilidade, permitindo a produção de cópias da sequência que se pretende amplificar, de forma exponencial, e específica a partir de uma sequência de DNA molde, por meio de síntese enzimática *in vitro* através de alternância de ciclos de temperatura, durante a reação, promovendo a desnaturação da fita molde, ligação dos oligonucleótidos iniciadores e extensão das novas cadeias de DNA pela ação da Taq

DNA polimerase. No final da reação obtêm-se cópias exatas do segmento-alvo (Saiki, 1985; Mullis & Faloona, 1987).

De forma a proceder ao diagnóstico molecular, todas as amostras biológicas, previamente processadas, têm de ser submetidas a um processo de extração de DNA. Existem vários métodos de extração de DNA descritos na literatura.

Para o diagnóstico de parasitoses humanas, os ácidos nucleicos podem ser extraídos de diferentes tecidos, como sangue, pele, músculo, entre outros. O método tradicional do fenol/clorofórmio (Sambrook et al., 1989) é ainda o método mais utilizado, sendo o que apresenta maior rendimento. Entretanto, são inúmeros os *kits* comerciais para a realização desse processo, muitos deles não utilizando solventes orgânicos que podem ser transportados e guardados à temperatura ambiente. Além disso, estes *kits* diminuem o tempo de extração, não aumentando o preço da técnica (Grisard & Steindel, 2001). Além desses, outros métodos diferenciados utilizando detergentes não-iônicos, como Tween®, Triton® e Nonidet® (atualmente chamado de Igepal®), também são descritos.

Ao extrair-se DNA total de determinado produto biológico com o intuito de pesquisar a presença de DNA de um agente patogénico, em particular, independente do método de extração e do produto a analisar, deve-se considerar o excesso de DNA do hospedeiro, o que pode, por vezes, levar a inibição da reação de amplificação. Dentre os possíveis inibidores, podemos citar, por exemplo, a presença excessiva de proteínas e, em particular, a hemoglobina. Da mesma forma, reagentes utilizados nos processos de extração podem levar a inibição da reação, como, por exemplo, resíduos de formol e fenol.

1.6. Tratamento das enteroparasitoses

As opções terapêuticas são variadas na maior parte das patologias. O medicamento ideal para o tratamento de um agente etiológico é aquele que interfere nas funções vitais e metabólicos do parasita e que não prejudica o hospedeiro (Prontuário de Medicamentos, 2000)

O metronidazol e o tinidazol são fármacos sintéticos utilizados no tratamento de protozoários, particularmente úteis no tratamento de infeções causadas por *E. histolytica* e *G. duodenalis* (Lullman, 2000).

Os derivados benzimidazóis (mebendazol, albendazol) são o grupo de fármacos mais amplamente utilizado, devido à sua alta eficácia e comodidade de administração.

Considerando a infecção por nemátodes (incluindo *E. vermicularis*, *A. lumbricoides*, *T. trichiura*) a taxas de cura usando esquemas de mebendazol ou albendazol atinge os 95% (Long et al., 2008).

Atualmente, o único fármaco aprovado pela FDA (do inglês “Food and Drug Administration”) dos EUA, para o tratamento da criptosporidiose em adultos e crianças, é a nitazoxanida. Contudo, a sua eficácia e segurança não estão completamente esclarecidas nos imunocomprometidos (White, 2003; Fox & Saravolatz, 2005). Neste grupo de risco, a paromomicina e a espiromicina têm sido utilizadas no tratamento de alguns doentes (Xiao & Cama, 2006).

1.7. Epidemiologia molecular

As técnicas de biologia molecular têm-se tornado cada vez mais importantes no contexto da epidemiologia das doenças infecciosas. Atualmente, a epidemiologia molecular é considerada um ramo da epidemiologia, cuja utilização de técnicas de biologia molecular para o estudo da distribuição e dos determinantes de ocorrência da doença nas populações, tem permitido fazer a caracterização dos agentes, da ecologia e da dinâmica de transmissão das doenças (Thompson et al. 1998; Foxman & Riley, 2001).

A heterogeneidade genética de *G. duodenalis* conduziu à formação de sete grupos genéticos ou genótipos distintos (A – G) (Cacciò & Ryan, 2008). Através de diversos estudos moleculares, observou-se que dos sete grupos genéticos, apenas o A e o B estão associadas à infecção em humanos, estando ambos amplamente distribuídos mundialmente. Aparentemente o grupo B é o mais prevalente dos dois. Os restantes grupos estão associados a infecções em outros hospedeiros específicos. Os genótipos C e D foram identificados em cães, gatos, coiotes e lobos, genótipo E em gado, ovelhas, cabras e porcos, e os genótipos F e G em gatos e roedores, respetivamente (Cacciò & Ryan, 2008).

Tendo em conta a variabilidade das manifestações clínicas da giardíase, segundo Homan e Mank (2001) e Adam (2001) existe diferença na patogenicidade entre os genótipos reportados que infetam o Homem – genótipo A e B. Estes autores nos seus estudos concluíram que existe forte correlação entre os casos de diarreia intermitente e moderada com o genótipo A e os casos de diarreia grave e persistente com o genótipo B. Contudo, os

estudos sobre esta possível associação entre uma maior patogenicidade e um grupo genético não são concordantes (Cacciò & Ryan, 2008).

A grande maioria dos estudos de genotipagem usa como genes alvo, SSU rRNA, β -giardina (bg), Triose–fosfato isomerase (tpi) e Glutamato desidrogenase (gdh) (Cacciò et al 2008). O gene SSU rRNA é utilizado por apresentar maior sensibilidade na detecção de DNA de *Giardia*, devido à sua natureza multicópia. Os restantes três genes apresentam alto grau de heterogeneidade genética para o género *Giardia* permitindo melhor diferenciação intragenotípica, ou seja a nível de subgenótipos (Cacciò & Ryan, 2008).

Para os microsporídeos no geral, e em particular, para os potencialmente patogénicos para o homem, é reduzido o número de sequências genéticas conhecidas, acessíveis para aplicação das técnicas de biologia molecular. A região genómica que codifica para o RNA dos ribossomas contém genes funcionais e conservados em termos evolutivos separados por regiões não codificantes e por regiões intergénicas que ligam as diferentes unidades génicas. O espaço entre regiões codificantes dos genes rRNA (ITS) é particularmente útil para a discriminação dos organismos ao nível da espécie e do género, porque a taxa de acumulação de mutações nesta região aproxima-se muitas vezes da taxa de especiação, razão pela qual muitas das estratégias de identificação e caracterização molecular, por PCR, dos microsporídeos se baseiam na amplificação desta região do genoma (Weiss & Vossbrinck 1999). A informação genética disponível para a maioria dos microsporídeos corresponde às sequências do gene da SSU rRNA. Por outro lado, também a caracterização intra-específica, só é possível para algumas espécies de microsporídeos, devido à existência de um número limitado de marcadores genéticos: a região ITS rRNA, pode apresentar desde um alto grau de polimorfismo, como o que se verifica na espécie *E. bienersi*, ou não ser detetada qualquer variabilidade genética como se encontra descrito para *E. intestinalis*.

Encontram-se descritos mais de 90 genótipos de *E. bienersi*: 64 dos quais, aproximadamente, identificados em humanos e 27 identificados nos humanos e outros animais (Matos e Lobo, 2015)

O diagnóstico molecular dos genótipos de *E. bienersi* baseiam-se na heterogeneidade da região ITS do gene do rRNA, esta região apresenta um elevado grau de polimorfismo (Mathis et al. 2005).

Os estudos epidemiológicos, a caracterização molecular e classificação dos genótipos e subtipos de *Cryptosporidium* têm sido realizados através do emprego dos *loci* SSU rRNA e glicoproteína de 60-kDa (GP60) (Jex et al. 2008), mas o gene SSU rRNA das espécies de

Cryptosporidium tem sido amplamente mais utilizado na genotipagem de *Cryptosporidium* spp. nos humanos, nos animais e nas amostras de água (Xiao, 2010), uma vez que para além de evoluir lentamente, caracteriza-se sobretudo pela presença de regiões polimórficas, alternadas com regiões conservadas devido a variações na sequência limitadas a várias regiões do gene (Xiao et al. 2004). O gene SSU rRNA apresenta quatro regiões potenciais de interesse, uma vez que revelaram variabilidade suficiente para discriminar as várias espécies e genótipos de *Cryptosporidium* (Xiao et al., 1999). Estas características tornam este marcador molecular extremamente útil na identificação de espécies de *Cryptosporidium*, uma vez que este apresenta variações de sequência intraespecífica relativamente baixa e variações interespecíficas relativamente elevadas (Jex et al. 2008).

1.8. Anemia

A anemia é definida como uma redução da concentração de hemoglobina ou volume de glóbulos vermelhos abaixo da faixa de valores que ocorrem em pessoas saudáveis (Lerner, 2011). As necessidades fisiológicas a esse nível dependem da idade, do género, da altitude de residência, do consumo de tabaco e dos estádios da gravidez (WHO, 2011). Existem também diferenças étnicas ao nível dos valores da concentração de hemoglobina (Lerner, 2011), contudo os dados que as comprovam ainda são escassos (WHO, 2011).

A anemia é caracterizada pela redução na capacidade de transporte de oxigénio através do sangue, de forma que a resposta das necessidades de oxigénio fisiológico do indivíduo fica comprometido. Além da deficiência de ferro, deficiências de outros micronutrientes (por exemplo, o folato, vitamina B12 e vitamina A), inflamação crónica e distúrbios hereditários na estrutura de hemoglobina podem causar anemia (WHO/UNICEF/UNU, 2001)

A prevalência de anemia é mais significativa em crianças em idade pré-escolar e em grávidas (Fleming et al., 2009). Geralmente as crianças só apresentam manifestações clínicas da anemia quando o valor da hemoglobina já é inferior a 7-8 g/dl, incluindo palidez, sonolência, irritabilidade e diminuição da tolerância ao esforço (Lerner, 2011). Independentemente da sua causa, á medida que a anemia se vai estabelecendo surgirá fraqueza, taquipneia, falta de ar ao esforço, taquicardia, dilatação cardíaca e insuficiência cardíaca de alto débito (Lerner, 2011).

A anemia é o resultado de três mecanismos básicos: perda de sangue (hemorragia), diminuição da produção de glóbulos vermelhos, e aumento da destruição de glóbulos vermelhos (hemólise) (Fleming et al., 2009). Pensa-se que, globalmente, a deficiência em ferro é a causa mais comum de anemia, mas existem outras causas, nomeadamente a deficiência em folato, vitamina B12 e vitamina A; a inflamação aguda e crónica; as infeções parasitárias; e as doenças hereditárias ou adquiridas que afetam a síntese da hemoglobina ou a produção e sobrevivência dos glóbulos vermelhos (WHO, 2011).

Os métodos mais recomendados para usar nos rastreios, que permitem determinar, por hemoglobinometria a prevalência de anemia numa dada população, são o método de cianometahemoglobina em laboratório e o sistema *HemoCue* (WHO, 2011). O primeiro é considerado o melhor método laboratorial para a determinação quantitativa da hemoglobina e o segundo, baseado no primeiro, é particularmente adequado para rastreios de campo, visto que é portátil e a sua etapa única de colheita de sangue e determinação da hemoglobina não requer a adição de reagentes líquidos (WHO, 2011).

1.9. OBJETIVO DO TRABALHO

1.9.1. Objetivo Geral

Averiguar a ocorrência de enteroparasitoses e de anemia nas crianças em idade escolar, de fatores de risco potenciais associados e fazer a caracterização molecular dos parasitas intestinais identificados nas fezes dos alunos, professores e funcionários da Escola Primária de Salina em Pedra Badejo, Ilha de Santiago, Cabo Verde.

1.9.2. Objetivos Específicos

1. Estimar a prevalência das enteroparasitoses nas crianças do Jardim infantil, da escolar primária, dos professores e outros funcionários com e sem sintomatologia gastrointestinal;
2. Identificar os fatores de risco potenciais (sociodemográficos e ambientais) e a sua relação com as parasitoses intestinais identificadas no estudo.
3. Avaliar a ocorrência de anemia nas crianças que participam do estudo e correlacionar com a frequência de enteroparasitas encontrada;

CAPÍTULO II:

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de Estudo

O estudo foi realizado na Escola Primária de Salina no Município de Santa Cruz, Ilha de Santiago, Cabo Verde.

O arquipélago de Cabo Verde, situado no continente Africano foi descoberto pelos Portugueses em 1460 e iniciada a sua colonização dois anos depois em 1462, numa simbiose entre Europeus e Africanos que deu origem ao um povo com características próprias. Este arquipélago é de origem vulcânica situado a 450 km da costa ocidental africana, a oeste do Senegal (Serralheiro, 1976).

Este arquipélago ocupa uma superfície de 4.033 km² e uma zona económica exclusiva de 700.000km², dividido em dois grupos denominados de Barlavento, ao norte e Sotavento, ao sul, de acordo com a posição que ocupam em relação ao vento dominante do Nordeste. Cabo Verde composto por 10 ilhas, das quais nove são habitadas e vários ilhéus. O clima é árido ou semiárido e as ilhas são relativamente dispersas e o relevo é bastante acidentado na sua maioria, tendo apenas cerca de 10% do seu solo como área propícia para agricultura (Albuquerque, 1991).

A ilha de Santiago, pertencente ao grupo de Sotavento, é a maior ilha do arquipélago de Cabo Verde (991km²) e nela se concentra cerca de metade da população do país (295 688 habitantes, 57,10%), da qual, a maior parte (131 453 habitantes, 44,46%) habita na cidade da Praia, capital do país. A Ilha é composta seis municípios: Santa Cruz, Tarrafal, São Miguel, São Lourenço dos Órgãos, São Salvador do Mundo e Santa Catarina (INE, 2010).

O Município de Santa Cruz foi inicialmente criado em 1972 abrangendo as freguesias de Santiago Maior e São Lourenço dos Órgãos. Este município localiza-se na parte Leste da Ilha de Santiago, cobrindo uma superfície total de 112km², faz fronteira com os municípios de S. Miguel à Norte, com S. Salvador do Mundo e S. Lourenço dos Órgãos à Oeste, a Sul com S. Domingos e a Este é delimitado pelo Oceano Atlântico.

Segundo dados do Censo 2010, o Município tem 26.609 habitantes, um dado que traduz uma densidade populacional de 154 habitantes/km². A cidade de Pedra Badejo, sede de Município de Santa Cruz, é a terceira maior Cidade da Ilha de Santiago em número de habitantes, só precedida de Assomada (Município de Santa Catarina) e Praia (Município de Praia).

De acordo com o Censo (2010), houve diminuição da população no município devido à emigração para as ilhas à procura de melhores condições de vida.

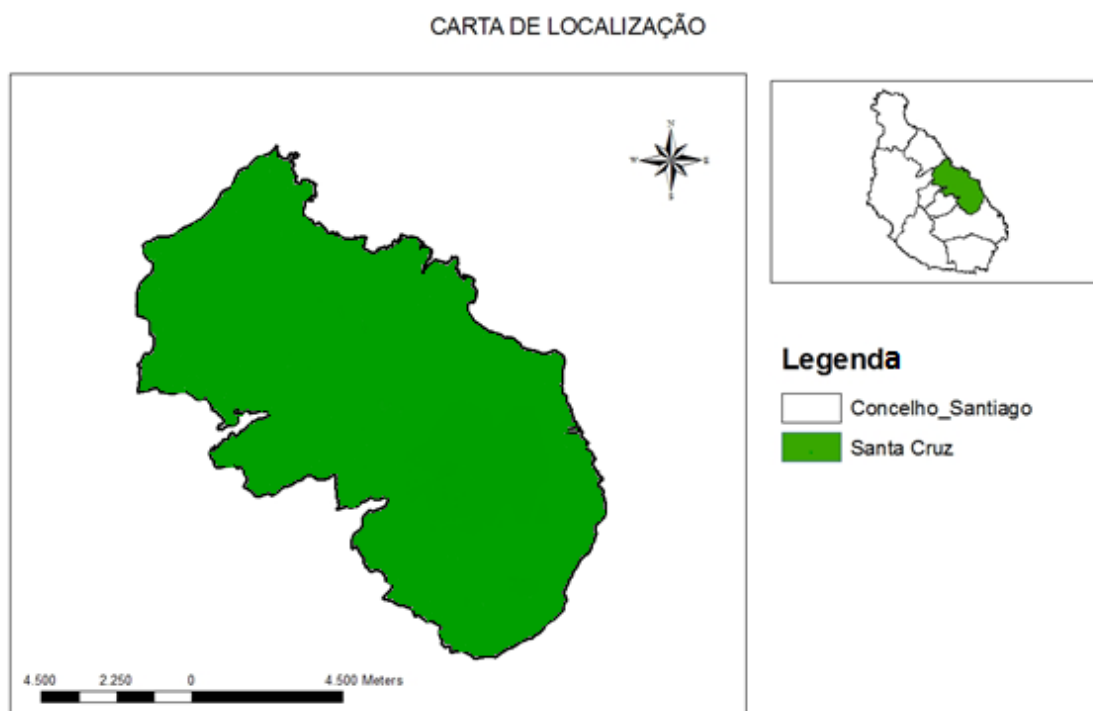


Figura 1: Localização geográfica do município de Santa Cruz. Plano Diretor Municipal de Santa Cruz, 2012.

A água potável consumida no município provém maioritariamente (82%) de um complexo de redes de furos. No entanto existem diversos poços cujo caudal de fornecimento é reduzido (PDM-Santa Cruz, 2011). Embora o município tenha água na rede todos os dias, cerca de 37% da população não tem água canalizada da rede pública, segundo o Censo 2010.

A rede de esgotos do município cobre quase totalmente a cidade, mas somente 7,8% da população a utiliza como sistema de evacuação das águas residuais, sendo que 30,5% utiliza a fossa séptica e mais de metade (61,4%) não utiliza nenhum sistema de evacuação das águas residuais. Essa fraca adesão da população à rede pública de esgoto deve-se ao facto de que 65,2% da população não ter nenhum tipo de instalação sanitária.

A rede do sistema de saúde no município é composta por um total de 18 estabelecimentos, sendo uma Delegacia de Saúde, um Centro de Saúde, nove Unidades Sanitárias de Bases, três Postos Sanitários, duas Farmácias (uma pública e uma privada) e

um Laboratório de Análises Clínicas incorporado no Centro de Saúde local (PDM-Santa Cruz).

A Delegacia de Saúde de Santa Cruz conta com um total de 85 funcionários afetos a este sector. Destes quatro são médicos, 19 enfermeiros, um técnico profissional de laboratório e três técnicos auxiliares, 16 agentes sanitários e 12 agentes de paludismo. O município conta com uma razão de 2,1 médicos/10000 habitantes; 0,4 farmacêuticos/10000 habitantes; e 3,9 enfermeiros/10000 habitantes (PDM-Santa Cruz, 2011; Relatório Estatístico da Saúde, 2010).

Segundo o Relatório Estatístico da Saúde de 2010, a principal causa da morbilidade das crianças atendidas na Delegacia de Saúde de Santa Cruz é a diarreia com sangue, sem desidratação ou com desidratação.

No que diz respeito à educação, no município funcionam os níveis de pré-escolar, Ensino Básico Integrado e Ensino Secundário. A rede do sistema educativo é composta por 61 estabelecimentos de ensino, 36 são estruturas do nível pré-escolar, 24 escolas de Ensino Básico Integrado, 13 polos educativos e uma Escola Secundária.

O Ensino Pré-escolar é assegurado por 36 jardins que cobrem a quase totalidade das localidades. O rácio crianças por profissionais de infância ronda os 22 e o rácio crianças por sala é de 29 (PDM-Santa Cruz, 2011).

O número de alunos do Ensino Básico Integrado tem sofrido algumas oscilações nos últimos sete anos, porém teve um ligeiro aumento no ano de 2003. Nos anos de 2006 a 2007 verificou-se uma queda acentuada, o que reflete a evolução demográfica do município.

Analisando as taxas de acolhimento dos alunos efetivos e o fluxo escolar durante o período de 2000 a 2008, nota-se que as escolas do ensino básico de Santa Cruz têm vindo a registar uma diminuição da sua taxa bruta de admissão, que se situa em torno de 68%, e a taxa líquida de admissão em 57% (PDM-Santa Cruz, 2011).

A rede de Ensino Básico Integrado no município possui 24 escolas com 115 salas organizadas em 13 polos educativos, cobrindo todas as localidades do município. O rácio alunos por sala é de 46 (PDM-Santa Cruz, 2011).

Atualmente o município possui uma única escola secundária que acolhe os alunos de todas as localidades do município. O rácio aluno/sala é de 77 neste nível e para reduzir o rácio alunos/ sala, algumas salas estão sendo redimensionadas.

Segundo os dados da QUIBB (2007), a taxa de alfabetização da população no município era de 72,3% sendo que o sexo feminino representava 64,3% desse total. Este

inquérito aponta que a população do município se dedica maioritariamente às atividades piscatória e agrícola, sobretudo na época das chuvas, e criação de gado, como meio de subsistência.

A pesca é uma atividade de alta importância no município. Contudo, a tendência é para diminuir por causa da extração de areia das praias e de outros fatores ambientais condicionantes.

A agricultura, praticada tanto em regime de sequeiro como de regadio, representa uma das principais atividades económicas do município. A agricultura de sequeiro é praticada nas zonas mais a montante, enquanto a agricultura de regadio temporário e permanente é realizada nas zonas mais a jusante das ribeiras, nos vales profundos e zonas do litoral (PDM-Santa Cruz, 2011).

Em relação à criação de gado pode-se afirmar que não tem sido muito produtiva devido às condições alimentares e de deficiente assistência técnica veterinária (PDM-Santa Cruz, 2011).

Uma grande parte da população na idade ativa encontra-se desempregada. Dos dados recolhidos constata-se que cerca de 50% da população é jovem e a maioria é desempregada (PDM-Santa Cruz, 2011). De acordo com o Censo 2010, a taxa de desemprego no município é de 10,9%, sendo mais elevada para o sexo feminino que para o sexo masculino. Quanto à taxa de atividade líquida, ela situa-se em 53,4%, sendo mais acentuada no sexo masculino.

2.1.1. Localidade de Salina e a Escola Primária

Salina é uma das 24 localidades do município de Santa Cruz. Fica situada na cidade de Pedra Badejo. É uma localidade que está a desenvolver-se gradualmente, com algumas infraestruturas importantes como rede pública de esgoto, água canalizada e energia elétrica.

A maioria da população residente é oriunda do interior de município e de outros municípios vizinhos. Nessa localidade encontra-se um dos polos educativos do município. Por fazer parte da região administrativa de Pedra Badejo, a maior parte das infraestruturas de necessidade pública encontra-se sedeadas na cidade de Pedra Badejo.

A Escola Primária de Salina, é um dos 13 polos educativos primários do município de Santa Cruz. Opera com 7 salas de aulas com turmas de 1ª a 6ª classe e um Jardim Infantil que funcionam em dois períodos com um total de 427 alunos, 14 professores e duas monitoras. No presente ano letivo a escola funciona com duas turmas do jardim infantil (1ª e segunda fase) duas turmas do 1ºano, duas turmas do 2ºano, duas turmas do 3ºano, três

turmas de 4ºano, duas turmas do 5º ano e três turmas do 6º ano, perfazendo um total de 14 turmas.

É uma escola cuja estrutura física está degradada, possui água canalizada, mas não é disponível todos os dias, por isso conservam a água num reservatório.

A escola possui um sanitário para os professores e um outro para os alunos, que nem sempre é usado frequentemente devido a disponibilidade de água todos os dias.

A escola possui energia elétrica em todas as salas de aula. Existe um horto escolar do qual extraem legumes para consumo interno. A cozinha é pequena, mas suficiente para preparar o lanche das crianças. Os alimentos são preparados por três cozinheiras capacitadas que já cuidam das refeições das crianças há mais de dez anos.

O ambiente dentro da escola é bem saudável, mas já ao redor da escola é diferente, não possui vedação e no momento do recreio as crianças brincam ao redor da escola que é um espaço de acesso de toda a comunidade e não é limpo. A poucos metros da escola existe um espaço onde algumas pessoas defecam e é um espaço de fácil acesso para as crianças da escola e da própria comunidade. Muitas vezes os alunos também defecam nesses espaços que se encontram a poucos metros da escola.

2.2. Desenho do Estudo

Este estudo transversal visa estimar a prevalência de parasitoses intestinais e de anemia em todas as crianças da escola básica e primária Cristil Zach de Salina, Santa Cruz, Ilha de Santiago, Cabo Verde.

Este é um estudo do tipo pesquisa e desenvolvimento que segundo Tobar (2001) intervêm na realidade para transformá-la, a partir dos conhecimentos adquiridos ou produzidos. Este estudo tem por propósito promover a saúde coletiva da população da localidade de Salina e quiçá do Município em geral.

O trabalho foi desenvolvido na Escola Primária de Salina, Santa Cruz, com todos os alunos que frequentaram a Escola Primária durante o período de novembro de 2015 a março de 2016.

Antes da realização do estudo de campo, foi feita uma reunião com os pais e encarregados de educação, como forma de informá-los sobre os propósitos do estudo como iria ser feito e quais as vantagens do estudo para o desenvolvimento da saúde dos alunos e da escola.

A metodologia utilizada para a recolha de dados foi a aplicação de um inquérito formulado pela investigadora com perguntas abertas e fechadas, baseado num conjunto de questões objetivas e de múltipla escolha, descrevendo a amostra populacional estudada, respondido pelos pais ou responsáveis pelas crianças. Como principais categorias de análise das condições socioeconómicas dos participantes do estudo foram selecionadas as seguintes variáveis: sexo, idade, quadro clínico, condições de moradia, nível de escolaridade dos pais, abastecimento de água, destino do lixo, hábitos de defecação e existência de animais em casa.

2.3. Amostra

Foram analisadas amostras de fezes de 427 crianças, 16 professores, três cozinheiras e uma secretária da Escola Primária Cristil Zach de Salina, Santa Cruz, Ilha de Santiago, Cabo-Verde. Por cada participante recolheu-se uma amostra de fezes e uma amostra de sangue (só das crianças).

As amostras de fezes foram colhidas num frasco de plástico estéril que era entregue aos alunos um dia antes da recolha de amostra e recolhido no dia seguinte pela investigadora. No dia da recolha da amostra era aplicado o questionário (ANEXO 1) aos pais ou encarregados de educação e os mesmos assinavam o Termo de Consentimento Informado (ANEXO 2). Aos alunos era feito a pesagem e a medição pela enfermeira da Delegacia de Saúde. Cada frasco da amostra de fezes dos alunos foi devidamente identificado tendo em conta o questionário previamente preenchido.

Todas as amostras de fezes recolhidas foram acondicionadas numa mala térmica e transportadas para o Laboratório de Biologia da Universidade de Cabo Verde (Unicv) para se efetuar parte do processamento das fezes.

Depois de ter sido feita a aplicação do questionário e recolha das amostras fecais de todos os alunos, professores e cozinheiras da escola, realizou-se a recolha de amostras de sangue, somente dos alunos pela Técnica Profissional do Laboratório da Delegacia de Saúde de Santa Cruz. Todas as amostras de sangue colhidas foram devidamente identificadas, acondicionadas numa mala térmica e transportadas para o Laboratório de Análises Clínicas da Delegacia de Saúde de Santa Cruz, onde foram analisadas e os resultados foram entregues à investigadora.

2.4. Diagnóstico parasitológico

Para a observação microscópica das amostras de fezes efetuou-se o seu processamento de forma a ter um sedimento concentrado para ser observado posteriormente. O processamento das amostras de fezes foi feito no Laboratório de Biologia da Unicv através do método de sedimentação difásica de Ritchie (modificado e adaptado por Casemore et al., 1985) e depois colocaram-se os sedimentos num eppendorf, os quais foram guardados no frigorífico a 4°C, até ao dia do transporte das amostras para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa para serem feitas as observações microscópicas e as técnicas de biologia molecular.

2.4.1. Método de sedimentação difásica de Ritchie adaptado da versão modificada e adaptada por Casemore *et al* 1985

A concentração das amostras fecais foi efetuada segundo o método de sedimentação difásica de Ritchie modificado e adaptado por Casemore et al (1985). Este método sofreu uma adaptação, não tendo sido utilizado o formol com o objetivo de, posteriormente, as amostras concentradas serem estudadas por técnicas moleculares (o formol é um dos possíveis inibidores da amplificação de DNA).

Este método, baseia-se na sedimentação através da centrifugação e na lavagem do material com éter, um solvente orgânico que forma uma fase apolar, que retém os artefactos vegetais e lípidos contidos na amostra. Durante a centrifugação da suspensão de fezes o método permite separar os constituintes das fezes, dos elementos parasitários, através da sua distribuição por duas fases líquidas, segundo o equilíbrio hidrofílico-lipofílico dos constituintes. A separação da fase líquida, contendo os elementos parasitários é realizada por sedimentação após centrifugação.

Procedimento:

- Dissolver com uma zaragatoa cerca de 0,5ml de amostra ou o equivalente de amostra sólida de fezes em 3ml de água destilada num tubo de centrífuga;
- Adicionar 2 ml de éter (Merck, Alemanha) e agitar vigorosamente no *vortex*;
- Colocar o funil com a gaze dobrada sobre um tubo cónico e filtrar o líquido e centrifugar a 1500 rpm, 5 minutos;
- Remover a parte etérea, e detritos com a ajuda de uma pipeta Pasteur;

- Retirar o sobrenadante e colocar num outro tubo cónico para centrifugar a 4500 rpm por 10 minutos. O primeiro sedimento resultante, é guardado para posterior pesquisa de ovos e quistos de parasitas;
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender bem o pellet. Com o sedimento resultante efetuaram-se esfregaços para posterior coloração;

2.4.2. Exame microscópico após concentração das amostras

A pesquisa dos parasitas nas fezes foi realizada através da microscopia ótica. Colocou-se uma gota do primeiro sedimento, resultante do processamento anterior, e uma gota de Lugol (Merck, Alemanha), entre lâmina e lamela, e observou-se ao microscópio ótico composto (JENAMED2). As lâminas preparadas foram observadas com objetivas de 10x, 20x e 40x, para identificação de ovos e quistos de parasitas presentes.

As amostras foram classificadas como positivas e negativas de acordo com a presença ou ausência de quistos e/ou ovos dos parasitas. De seguida foi feito um esfregaço de cada amostra de fezes (segundo sedimento), para ser corado pelo método de Ziehl-Neelsen modificado.

2.4.3. Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada (adaptado de Casemore et al, 1985)

Nesta coloração o oocisto aparece densamente corado de vermelho e as paredes aparecem refringentes a rodear a estrutura interna, claramente distinguível contra o fundo verde. A morfologia varia entre uma massa amorfa e estruturas esporuladas múltiplas em forma crescente contendo um número variável de corpúsculos internos azul-escuros (Bronsdon, 1984; Casemore et al. 1985; Alpert et al, 1986).

Procedimento:

- i. Secar o esfregaço fecal à temperatura ambiente.
- ii. Fixar o esfregaço com Metanol (Panreac Química S.A.U.) durante 1 minuto.
- iii. Mergulhar o esfregaço em Fucsina básica fenicada (Fucsina básica em pó 1% m/v Fenol cristalizado 5% m/v, Álcool absoluto 10% v/v) (Deltalab, Espanha), durante 10 minutos.
- iv. Lavar com água corrente.

- v. Descorar com Álcool clorídrico 1% (etanol absoluto [Riedel-de Häen®]; ácido clorídrico [Riedel-de Häen®]) até não se libertar mais.
- vi. Lavar com água corrente.
- vii. Cobrir o esfregaço com azul -de-metileno (Panreac Química S.A.U.), durante 30 segundos;
- viii. Lavar com água corrente;
- ix. Após a secagem das lâminas á temperatura ambiente, efetuar a sua montagem em meio entellan (Merk, Alemanha);
- x. Observar ao microscópio ótico com objetivas de x40 e de imersão (x100).

2.5. Diagnóstico molecular

Após uma detalhada revisão de literatura descrita e para apresentação de resultados fidedignos, neste estudo, todas as amostras foram submetidas a diagnóstico molecular, uma vez que o diagnóstico parasitológico apresenta tem menor sensibilidade e especificidade do que as técnicas de biologia molecular. Para tal, fez-se a extração do DNA de todas as amostras (após a concentração das amostras pela técnica de sedimentação difásica de Ritchie modificado), e o produto desta extração permaneceu armazenado a -20°C até ser usado para efetuar a *nested*-PCR para deteção do DNA dos protozoários patogénicos com maiores taxas de prevalência descritas na literatura, nomeadamente *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e do microsporídeo *Enterocytozoon bienersi*.

2.5.1. Extração de DNA

O material genético dos parasitas foi extraído, recorrendo-se a um protocolo comercial (QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit, QIAGEN) e a técnica foi executada com base nas instruções do fabricante.

Procedimento:

1. Em tubo eppendorf de 1,5ml adicionou-se 200µl do sedimento e 500µl do tampão InhibitEX, em cada tubo, homogeneizou-se vigorosamente no vórtex por 1 minuto.
2. Incubou-se a 70°C , durante 10 minutos, com homogeneização no vórtex a cada 5 minutos.
3. Fez-se uma centrifugação a 1500 rpm durante 1 minuto.
4. Num novo tubo adicionou-se 10µl Proteinase K.

5. Adicionou-se ao tubo com a Proteinase K todo o sobrenadante do centrifugado e 250µl do tampão AL e agitou-se no *vórtex* por 1 minuto.
6. Incubou-se a 70°C por 15 minutos, homogeneizou-se no *vórtex* a cada 5 minutos.
7. Adicionou-se 225µl de Etanol (96-100%) e agitou-se bem no *vórtex*.
8. Transferiu-se 600µl da mistura para a coluna (QIAamp spin column) e centrifugou-se a 1500rpm por 1 minuto. Repetiu-se este passo até que toda a mistura fosse centrifugada.
9. Adicionou-se à coluna 500µl do tampão AW1 e centrifugou-se a 1500rpm durante 1 minuto e desprezou-se o filtrado.
10. Adicionou-se à coluna 500µl do tampão AW2 e centrifugou-se a 1500 rpm durante 3 minutos e desprezou-se o filtrado.
11. Para garantir a eliminação total dos reagentes de lavagem fez-se uma nova centrifugação da coluna por 3 minutos.
12. Transferiu-se a coluna para um novo tubo eppendorf e adicionou-se cuidadosamente à coluna 80µl do tampão ATE no centro da matriz de sílica e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos.
13. Centrifugou-se o tubo, contendo a coluna, durante 2 minutos, desprezou-se a coluna e guardou-se o tubo contendo a amostra do DNA a -20°C.

2.5.2. *Nested-PCR*

A técnica de *nested-PCR* é uma variante da técnica da PCR simples, que tem como objectivo amplificar uma determinada região alvo de DNA do microorganismo, utilizando os produtos do DNA amplificados na primeira reação, como molde para uma segunda reação. Este método utiliza um par de oligonucleótidos iniciadores na primeira etapa, seguida por uma segunda reação com recurso a um par de oligonucleótidos iniciadores diferente do anterior, mais interno, e que têm como região alvo o primeiro produto de DNA amplificado. Esta técnica tem como vantagem aumentar a especificidade e sensibilidade da técnica de PCR (Mothershed & Whitney, 2005).

2.5.2.1. Amplificação do gene β -giardina da *Giardia duodenalis*

- i. A primeira reação de amplificação foi efetuada num volume total de 25µl, contendo cada um dos seguintes componentes:

- ii. 3,0µl de 10 × tampão (tampão de reação) (670 mM Tris-HCl [pH 8.8], 160 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween-20) (Bioline).
- iii. 1,5µl de MgCl₂ (50 mM) (Bioline).
- iv. 0,4mM de uma mistura dos dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Applied Biosystems).
- v. 10 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores (Quadro 1).
- vi. 2,0µl de BSA (10 mg/ml) (Fermentas, Reino Unido).
- vii. 0,75 U de Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline).
- viii. 3,0µl de DNA genômico obtido após extração pelo método QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit da QIAGEN.
- ix. Água desionizada estéril para preencher o volume final de 25µl.

Posteriormente, a mistura foi distribuída nos microtubos para PCR de acordo com o número de amostras a processar e todos os microtubos foram submetidos a um *short spin* na micro-centrífuga 5415 D (*Eppendorf*) a fim de homogeneizar a mistura.

Para a segunda reação de amplificação utilizaram-se mesmos reagentes nas mesmas concentrações para realizar a mistura reacional com exceção dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados (GiaFW2 e GiaRV2), e da BSA (cuja concentração diminui para 1.0µl) usando-se 4µl de produto de PCR da primeira reação.

Quadro 1- Sequências nucleotídicas utilizados nas duas etapas da *nested*-PCR para amplificação do gene da β -giardina de *Giardia duodenalis*, com indicação do fragmento amplificado.

Gene	PCR	Sequências nucleotídeas	Sequência	Fragmento amplificado (pb)	Referência
β -giardina	1°	GiaFW1	5'- AAG CCC GAC GAC CTC ACC CGC AGT GC -3'	753	Cacciò <i>et al.</i> , 2002
		GiaRV1	5'- GAG GCC GCC CTG GAT CTT CGA GAC GAC -3'		
	2°	GiaFW2	5'- GAA CGA ACG AGA TCG AGG TCC G -3'	511	Lalle <i>et al.</i> 2005
		GiaRV2	5'- CTC GAC GAG CTT CGT GTT -3'		

Em cada reação foi preparada um controlo negativo (água desionizada estéril), com todos os reagentes referidos anteriormente exceto a amostra de DNA e um controlo positivo em que utilizou-se uma suspensão de DNA de *G. duodenalis* previamente caracterizada no laboratório e disponibilizada pelo Grupo Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários (GPOOP), como forma de monitorizar a qualidade dos resultados. As reações de amplificação foram realizadas num Termociclador automático (Biometra®) programado de acordo com as condições do quadro 2.

Quadro 2- Condições utilizadas no processo de amplificação do DNA do gene da β -giardina de *Giardia duodenalis* por *nested*-PCR (adaptado de Cacciò et al., 2002 e Lalle et al., 2005).

Gene	Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
β - giardina	Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
	Desnaturação	94°C	45 segundos	35
	Ligação*	65°C/55°C	45 segundos	
	Extensão	72°C	1 minutos	
	Extensão final	72°C	10 minutos	1

* As condições de amplificação na primeira e na segunda reação são iguais, à exceção da temperatura de ligação (1ª reação: 65°C; 2ª reação: 55°C).

2.5.2.2. Amplificação do locus SSU rRNA do *Cryptosporidium spp.*

A primeira reação de amplificação foi efetuada num volume total de 25µl, contendo cada um dos seguintes componentes:

- 3,0µl de 10 × Tampão (tampão de reação) (670 mM Tris-HCl [pH 8.8], 160 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween-20) (Bioline).
- 1,5µl de MgCl₂ (50 mM) (Bioline).
- 0,4mM de uma mistura dos dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Applied Biosystems).
- 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (Quadro 3).
- 2,0µl de BSA (10 mg/ml) (Fermentas, Reino Unido).
- 0,75 U de Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline).

- vii. 3,0µl de DNA genómico obtido após extração pelo método QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit da QIAGEN.
- viii. Água desionizada estéril para preencher o volume final de 25µl.

Posteriormente, a mistura foi distribuída nos microtubos para PCR de acordo com o número de amostras a processar e todos os microtubos foram submetidos a um *short spin* na micro-centrífuga 5415 D (*Eppendorf*) a fim de homogeneizar a mistura.

Para a segunda reação de amplificação utilizaram-se mesmos reagentes nas mesmas concentrações para realizar a mistura reacional com exceção dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados (CrySSU3 e CrySSU4) e da BSA (cuja concentração diminui para 1.0µl) e usando-se 4µl de produto de PCR da primeira reação.

Quadro 3- Sequências nucleotídicas utilizados nas duas etapas da *nested-PCR* para amplificação do locus SSU rRNA de *Cryptosporidium spp.*, com indicação do fragmento amplificado.

Gene	PCR	Sequências nucleotídeas	Sequência	Fragmento amplificado (pb)	Referência
SSU rRNA	1º	CrySSU1	5' – TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG – 3'	1325	Xiao et al., 1999
		CrySSU2	5' – CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA – 3'		
	2º	CrySSU3	5' – GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG – 3'	831-838	
		CrySSU4	5' – AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A – 3'		

Em cada reação foi preparado um controlo negativo (água desionizada estéril), com todos os reagentes referidos anteriormente exceto a amostra de DNA e um controlo positivo em que utilizou-se uma suspensão de DNA de *Cryptosporidium spp.* previamente caracterizada no laboratório e disponibilizada pelo GPOOP, como forma de monitorizar a qualidade dos resultados As reações de amplificação foram realizadas num Termociclador automático (Biometra®) programado de acordo com as condições do quadro 4.

Quadro 4- Condições utilizadas no processo de amplificação do DNA do *locus* SSU rRNA de *Cryptosporidium spp.* por *nested-PCR* (adaptado de Xiao et al., 1999).

Gene	Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
SSU rRNA	Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
	Desnaturação	94°C	45 segundos	35
	Ligação	56°C	45 segundos	
	Extensão	72°C	1 minutos	
	Extensão final	72°C	10 minutos	1

*As condições de amplificação na primeira e na segunda reação são iguais.

2.5.2.3. Amplificação do *locus* ITS rRNA do *Enterocytozoon bieneusi*

A primeira reação de amplificação foi efetuada num volume total de 25µl, contendo cada um dos seguintes componentes:

- 3,0µl de 10 × Tampão (tampão de reação) (670 mM Tris-HCl [pH 8.8], 160 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween-20) (Bioline).
- 1,5µl de MgCl₂ (50 mM) (Bioline).
- 0,4mM de uma mistura dos dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Applied Biosystems);
- 10 pmol de cada um dos oligonucleotideos iniciadores (Quadro 5).
- 2,0µl de BSA (10 mg/ml) (Fermentas, Reino Unido).
- 0,75 U de Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline).
- 3,0µl de DNA genómico obtido após extração pelo método QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit da QIAGEN.
- Água desionizada estéril para preencher o volume final de 25µl.

Posteriormente, a mistura foi distribuída nos microtubos para PCR de acordo com o número de amostras a processar e todos os microtubos foram submetidos a um *short spin* na micro-centrífuga 5415 D (*Eppendorf*) a fim de homogeneizar a mistura.

Para a segunda reação de amplificação utilizaram-se mesmos reagentes nas mesmas concentrações para realizar a mistura reacional com exceção dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados (EBMLL F2 e EBMLL R2) e da BSA (foi excluída) e usando-se 4µl de produto de PCR da primeira reação.

Quadro 5- Sequências nucleotídicas utilizados nas duas etapas da *nested-PCR* para amplificação do *locus* ITS rRNA do *Enterocytozoon bieneusi*, com indicação do fragmento amplificado.

Gene	PCR	Sequências nucleotídeas	Sequência	Fragmento amplificado (pb)	Referência
ITS rRNA	1º	EBMLL F 1	5'- CGC CCG TCA CTA TTT CAG AT- 3'	514	Lobo <i>et al.</i> , 2012
		EBMLL R1	5'-GCT TAA GTC CAG GGA GTA TCC A - 3'		
	2º	EBMLL F2	5'-AGT CGT AAC AAG GTT TCA GTT GG - 3'	386	
		EBMLL R2	5'-GGA CTT TTC GCA TTC TTT CG - 3'		

Em cada reação foi preparada um controlo negativo (água desionizada estéril), com todos os reagentes referidos anteriormente exceto a amostra de DNA e um controlo positivo em que utilizou-se uma suspensão de DNA *E. bieneusi* de previamente caracterizada no laboratório e disponibilizada pelo GPOOP, como forma de monitorizar a qualidade dos resultados. As reações de amplificação foram realizadas num Termociclador automático (Biometra®) programado de acordo com as condições do quadro 6.

Quadro 6- Condições utilizadas no processo de amplificação do DNA do *locus* ITS rRNA de *Enterocytozoon bieneusi* por *nested-PCR*.

Gene	Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
ITS rRNA	Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
	Desnaturação	95°C	50 segundos	30
	Ligação	55°C	30 segundos	
	Extensão	72°C	30 segundos	
	Extensão final	72°C	10 minutos	1

*As condições de amplificação na primeira e na segunda reação são iguais.

2.5.3. Visualização dos produtos de PCR

Os produtos de PCR obtidos na segunda reação da *nested-PCR* para os genes alvo em estudo foram posteriormente submetidos a uma eletroforese em gel de agarose SeaKem® LE (FMC BioProducts) a 1,5% em tampão Tris – Acetato – EDTA (TAE) 1x (40x mM Tris-Acetato; 1mM EDTA; pH 8,3). A eletroforese em gel é um método de separação de uma mistura de moléculas através de uma fase estacionária (agarose ou poliacrilamida) submetida a um campo elétrico. Os produtos de PCR são carregados em poços moldados durante a preparação do gel e, de seguida aplica-se um campo elétrico para separar os amplicões. As frações separadas são visualizadas no transiluminador sob luz ultra-violeta (UV) devido à emissão de fluorescência do brometo de etídio que é um corante que se liga exclusivamente à cadeia do DNA (Newton, 1995).

Procedimento:

1. Dissolveu-se 1,5g de agarose SeaKem® LE (FMC BioProducts) em 100mL de solução tampão TAE 1x (40x mM Tris-Acetato; 1mM EDTA; pH 8,3) e aqueceu-se no microondas até que a solução ficasse homogênea e transparente.
2. Em seguida, adicionou-se 5 µl de Brometo de etídio (0,5 µg/ml, Merck®) e verteu-se o preparado para um suporte de eletroforese, onde previamente se colocou o pente apropriado para aplicação das amostras e deixou-se a polimerizar.
3. Posteriormente, colocou-se o gel na tina de eletroforese e encheu-se a tina com a solução tampão TAE 1x de modo a que o gel ficasse completamente imerso.
4. De seguida, aplicaram-se as amostras nos vários poços. Cada amostra aplicada consistiu na mistura de 16µl do produto de PCR a analisar com 1,5µl de solução de aplicação loading tampão (0,03% azul de bromofenol, 0,03% xileno cianol FF, 60% glicerol, 60 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl [pH 7.6]) (Fermentas, Reino Unido) (Loading Dye Solution-Fermentas®). A migração dos produtos de PCR no gel foi realizada simultaneamente com um marcador de massa molecular de 100 bp (Gene Ruler TM 100bp DNA Ladder, Fermentas®), tendo-se adicionado a 1µl do marcador, 1,5 µl de 6 × DNA loading dye e 15µl de água de desionizada estéril.
5. A migração dos fragmentos de DNA amplificados com uma voltagem constante de 80V durante 60 minutos, no Agarose Gel Electroforesis Systems (Bio-Rad®, França), constituído pela tina de eletroforese (SubCell® GT) e uma fonte alimentadora de corrente (Power Pac HC).

6. Por fim, realizou-se a visualização dos produtos amplificados no transiluminador sob luz ultravioleta (Viber Lourmat) devido à emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado na cadeia de DNA. As bandas de interesse foram excisadas do gel com a ajuda de um bisturi e conservados em *eppendorf*, a 4°C.

2.5.4. Purificação dos produtos de PCR

Para submeter à técnica de sequenciação, os produtos PCR dos *loci* β -*giardina*, SSU-RNA e ITS, obtidos das segundas reações de amplificação, foram posteriormente purificados com o *kit* comercial (JETQUICK PCR Product Purification Spin kit; Genomed).

Procedimento:

De acordo com as instruções do fabricante, o referido protocolo de purificação consiste em quatro etapas bem definidas: solubilização da agarose, adsorção do DNA, lavagem e eluição do DNA.

1ª Etapa: as bandas excisadas dos géis que se encontravam conservados a 4°C foram colocadas cada uma em tubo *eppendorf* de 1,5 ml. Por cada 100 mg do gel de agarose, adicionou-se, proporcionalmente, 250 µl da solução L1. Incubou-se a mistura a 50°C durante 30 minutos, agitando-se vigorosamente, em intervalos de 10 minutos

A solução L1 é composta por percloroeto de sódio (NaClO₄), uma substância que, quando utilizada em altas concentrações, remove complexos proteicos presentes em solução: acetato de sódio (C₂H₃NaO₂), cuja ação visa precipitar os ácidos nucleicos em solução; e Tris-Borato-EDTA (TBE), um tampão que, em conjunto com o aumento da temperatura, auxilia na solubilização da agarose.

2ª Etapa: O passo seguinte consistiu na adsorção do DNA: passados os 30 minutos, transferiu-se a mistura para um tubo *eppendorf* de 2 ml contendo a coluna JETQUICK spin no seu interior, de seguida transferiu-se a coluna, até o máximo 600µl por coluna, da mistura obtida e centrifugou-se a 12500rpm durante 1 minuto. No final, descartou-se o filtrado e seguidamente, colocou-se a coluna num novo tubo *eppendorf* de 1,5 ml, adicionou-se aos 500µl de solução L1 e aguardou-se 1minuto. Voltou-se a centrifugar seguindo o mesmo procedimento e desprezou-se o filtrado.

3ª Etapa: transferiu-se a coluna para um novo tubo e adicionou-se 250µl da solução H2 e aguardou-se 5 minutos. Posteriormente, centrifugou-se a 12500 rpm durante 1 minuto e desprezou-se o filtrado. Voltou-se a centrifugar seguindo o mesmo procedimento.

Desprezou-se o filtrado, colocou-se novamente a coluna no tubo e promoveu-se nova centrifugação, igual à anterior, descartando-se, no final, o tubo com o filtrado, como forma de garantir a eliminação total da solução de lavagem.

A solução H2 é composta por EDTA, um forte agente quelante, aplicado para aprisionar iões monovalentes: Tris-HCl, um tampão que auxilia na manutenção do pH, funcionando como agente estabilizador da solução; etanol, que funciona como um forte solvente orgânico; e cloreto de sódio, utilizado para manter e estabilizar as cargas iónicas.

4ª Etapa: colocou-se a coluna num tubo *eppendorf* de 1,5 ml e adicionou-se 50 µl da solução tampão TE, pré-aquecida a 65°C, diretamente no centro da matriz de sílica e aguardou-se 5 minutos. Centrifugou-se a 12500rpm, durante 2 minutos e no final recuperou-se o filtrado com o DNA purificado.

Os produtos de amplificação purificados foram conservados à uma temperatura de -20°C para posterior sequenciação de DNA.

2.6. Critérios de Inclusão e Exclusão

Deste estudo fizeram parte todas as crianças que frequentavam a Escola Primária Cristil Zach de Salina, Santa Cruz, Ilha de Santiago, Cabo-Verde, com e sem diarreia. Os professores e outros funcionários da escola, com e sem sintomatologia gastrointestinal.

Do estudo foram excluídos todas as crianças, professores ou funcionário da escola que não quiseram fazer parte do estudo ou que não entregaram amostra de fezes para serem analisadas.

2.7. Aspetos éticos

Para assegurar e salvaguardar a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os potenciais participantes deste estudo e de acordo com o Decreto – Lei nº 26/2007 de 30 de julho de Cabo Verde, o projeto de pesquisa deste estudo foi submetido para aprovação, no dia 31 de Julho de 2015, ao Comité Nacional da Ética para Pesquisa em Saúde (CNEPS) tendo sido aprovado no dia 24 setembro de 2015 (ver anexo).

2.8. Análise dos dados

As respostas ao questionário e os resultados obtidos do diagnóstico parasitológico e de biologia molecular foram armazenados em *software* Excel 2010. O processamento dos dados foi feito no *software* SPSS v.20 e depois analisado.

O teste de Chi-quadrado (χ^2) foi aplicado para investigar a associação entre variáveis qualitativas com diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre as variáveis em estudo. Os dados foram agrupados em tabelas de contingência de duas entradas e a análise foi efetuada com intervalo de confiança de 95%.

2.9. Avaliação Nutricional

As medidas antropométricas (peso e altura) foram avaliadas em cada criança individualmente com o intuito de se obterem informações referentes ao desenvolvimento das crianças. Os resultados obtidos foram calculados de acordo com a referência da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2006). O peso foi avaliado com as crianças com roupa e sem sapatos numa balança *Seca 884* com precisão de 0,1kg, tendo sido considerado os valores: $< 85\%$ baixo peso, 85-94,9% peso normal e $\geq 95\%$ sobrepeso. Os parâmetros foram utilizados como auxiliar na avaliação das crianças quanto ao peso que apresentavam para a sua idade, se estava normal ou não.

A altura foi avaliada com um estadiómetro de parede *Sunny 10* com precisão de 0,1cm com as crianças sem sapato e com cabeça da criança posicionada de acordo com o plano de *Frankfurt*. Determinou-se os valores de acordo com a idade de cada criança e classificado como pouco desenvolvido ($< 60\%$), desenvolvimento normal (60-74,9%) e desenvolvimento alto ($\geq 75\%$).

2.10. Diagnóstico da Anemia

Foi realizada uma única avaliação da concentração de hemoglobina através do analisador hematológico automatizado, *Sysmex 140*, para leitura direta em amostras sanguíneas obtidas através punção venosa. A amostra foi colhida e conservada em tubos de colheita contendo EDTA, e o resultado final foi expresso em g/dl.

A classificação das crianças em anémicas ou não anémicas realizou-se de acordo com os valores de referência da WHO (2001): crianças dos 6 aos 59 meses (4 anos e 9 meses) – $< 11,0\text{g/dl}$, crianças dos 5 aos 11 anos – $< 11,5\text{g/dl}$ e crianças dos 12 aos 14 anos – $< 12,0\text{g/dl}$.

CAPITULO III:

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização demográfica

O estudo teve como população alvo 447 participantes entre crianças, professores e pessoal administrativo da Escola Primária de Salina, no ano letivo 2015/2016, mas destes só 433 (97%) participantes foram incluídos no estudo por apresentarem todos os critérios possíveis para a sua inclusão.

Dos 433 participantes, 74 (17,1%) eram crianças do Jardim Infantil, 342 (79,0%) crianças da Escola Básica que estudavam do 1º ao 6º ano de escolaridade e 17 (3,9%) adultos que trabalham na escola, professores, cozinheiras e pessoal administrativo. O estudo teve mais participantes do sexo masculino (52,7%) do que os do sexo feminino (47,3%). Tanto no Jardim Infantil como na Escola Primária houve maior representação masculina (56,8% e 53,5% respetivamente) e entre os professores e pessoal administrativo houve maior representação feminina com 82,4% do total (Quadro 7).

Quadro 7 – Distribuição dos participantes quanto ao sexo de acordo com os grupos estudados

	Jardim Infantil	Escola Primária	Professores	Total
	N=74	N=342	N=17	N=433
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Feminino	32 (43,2)	159 (46,5)	14 (82,4)	205 (47,3)
SEXO				
Masculino	42 (56,8)	183 (53,5)	3 (17,6)	228 (52,7)

N – Número total de indivíduos em cada grupo estudado; n- Número de amostra; % - Percentagem das ocorrências

O estudo teve a participação de 416 crianças com idades compreendidas entre 2 e 14 anos, sendo que no jardim infantil as crianças tinham idades compreendidas entre 2 e 6 anos e na escola primária tinham idades que variavam entre os 6 e os 14 anos. Nas crianças do jardim infantil a idade mais prevalente foi os 4 anos (43,2%) e a menos prevalente foi os 2 anos (1,4%) (Gráfico1). Na escola primária a maior percentagem das crianças tinha 7 anos

de idade (18,7%), seguida dos 10 e 11 anos com 16,7% e 17,0%, respetivamente, e a idade menos prevalente foi 14 anos (2,0%) (Gráfico 2).

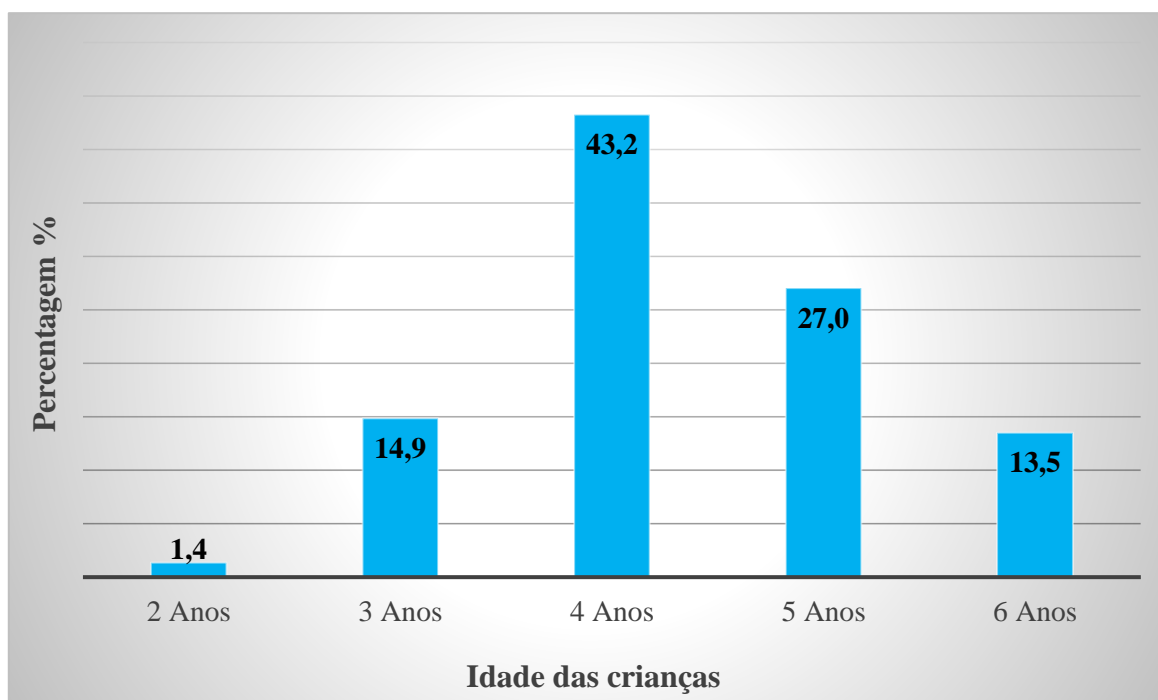


Gráfico 1 – Idade das crianças do Jardim Infantil que participaram no estudo (N=74)

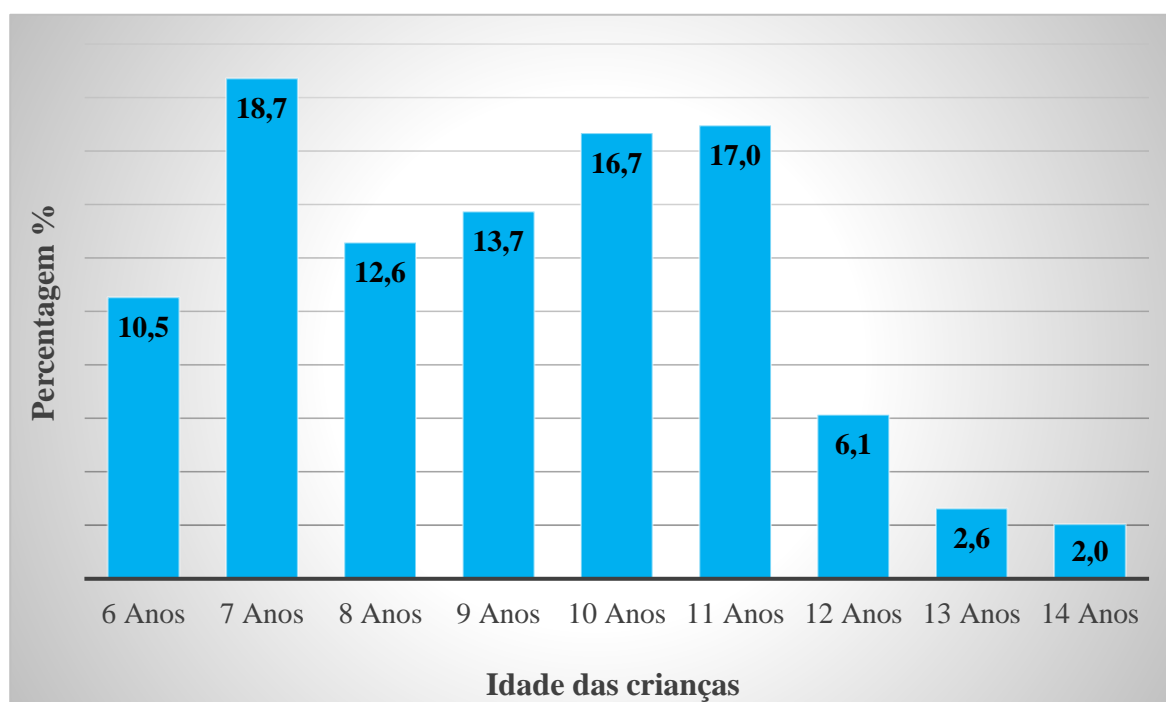


Gráfico 2 – Idade das crianças da Escola Primária participantes no estudo (N=342)

Caracterizando epidemiologicamente o estudo constatou-se que 90,5% dos participantes apresentavam algum tipo de sintomas como febre, diarreia, dor abdominal, vômito e dor de cabeça num período de menos de um ano antes de o estudo ser feito. Dos sintomas identificados a dor abdominal teve maior ocorrência (77,1%), seguida de febre (74,8%), dor de cabeça (61,9%), diarreia (56,1%) e vômito (53,1%) (Quadro 8).

Analisando o índice altura para a idade, observou-se que a maioria (87,0%) das crianças que participaram do estudo apresentavam desenvolvimento abaixo dos 85%, os restantes alunos (8,9%) tinham altura para a idade entre os 85% e os 94,9% e apenas 4,1% tinham a altura $\geq 95\%$. Quanto ao índice peso para a idade 82,9% das crianças que participaram do estudo tinham um desenvolvimento $< 60\%$, 7,7% tinham peso entre os índices 60 – 74,9% e 9,4% tinham peso $\geq 75\%$ (Quadro 8).

Dos responsáveis pelas crianças que acompanharam os alunos no dia da recolha da amostra de fezes e responderam ao questionário, 53,4% (222/433) eram os pais das crianças, os quais tinham maior representação nas crianças do jardim infantil 68,9% (51/74), 45,4% (189/433) eram familiares (avós, tios, irmãos, primos, etc.), dos quais a maior representação encontrava-se no grupo das crianças da escola primária 48,5% (166/342) e apenas 1,2% (5/433) eram outras pessoas que se responsabilizaram pelas crianças (Quadro 8).

Relativamente ao grau de escolaridade dos responsáveis pelas crianças observou-se que 58,9% (245/433) destes tinham frequentado o ensino secundário, completo ou incompleto, 32,2% (134/433) tinham feito apenas o ensino primário, 4,6% (19/433) não eram alfabetizados e 4,3% (18/433) afirmaram estar a frequentar ou já terminaram a licenciatura (Quadro 8).

No quadro 9 encontram-se as informações referentes à situação de higiene e saneamento básico do meio em que vivem os participantes do estudo. Com base nas respostas dadas no questionário, 99,5% (431/433) do total dos participantes utilizavam água canalizada para beber e preparar alimentos para consumo. A casa de 40,4% (175/433) dos participantes estava ligada a uma fossa séptica, 27,9% (121/433) dos participantes tinham as suas casas ligadas a uma rede pública de esgoto e 31,6% (141/433) dos participantes não tinham nenhum tipo de ligação para os esgotos, os dejetos iam diretamente para o ambiente ao ar livre. O sistema de colheita de lixo na localidade de Salina funciona bem para 66,1% (286/433) dos participantes deste estudo, os quais têm o lixo colhido pelas equipas de

saneamento da Câmara Municipal, mas ainda 32,6% (141/433) jogam o lixo ao redor das moradias e 1,4% (6/433) queima o lixo que produz (Quadro 9).

Quadro 8 – Frequência das variáveis clínicas, epidemiológicas e sociodemográficas de acordo com os grupos estudados

	Jardim Infantil N=74 n (%)	Escola Primária N=342 n (%)	Professores N=17 n (%)	Total das ocorrências N=433 n (%)
SINTOMATOLOGIA				
Sim	64 (86,5)	322 (94,2)	6 (35,3)	392 (90,5)
Não	10 (13,5)	20 (5,8)	11 (64,7)	41 (9,5)
FEBRE				
Sim	54 (73,0)	267 (78,1)	3 (17,6)	324 (74,8)
Não	20 (27,0)	75 (21,9)	14 (82,4)	109 (25,2)
DIARREIA				
Sim	39 (52,7)	201 (58,8)	3 (0,7)	243 (56,1)
Não	35 (47,3)	141 (41,2)	14 (82,4)	190 (43,9)
DOR ABDOMINAL				
Sim	48 (64,9)	281 (82,2)	5 (29,4)	334 (77,1)
Não	26 (35,1)	61 (17,8)	12 (70,6)	99 (22,9)
VÔMITO				
Sim	32 (43,2)	196 (57,3)	2 (11,8)	230 (53,1)
Não	42 (56,8)	146 (42,7)	15 (88,2)	203 (46,9)
DOR DE CABEÇA				
Sim	18 (24,3)	245 (71,6)	5 (29,4)	268 (61,9)
Não	56 (75,7)	97 (28,4)	12 (70,6)	165 (38,1)
ALTURA PARA A IDADE				
<85%	71 (95,9)	291 (85,1)	NA	362 (87,0)
85 – 89,9%	2 (2,7)	33 (9,6)	NA	35 (8,4)
90 – 94,9%	0 (0)	2 (0,6)	NA	2 (0,5)
≥95%	1 (1,4)	16 (4,7)	NA	17 (4,1)
PESO PARA A IDADE				
<60%	63 (85,1)	282 (82,5)	NA	345 (82,9)
60 – 74,9%	1 (1,4)	31 (9,1)	NA	32 (7,7)
≥75%	10 (13,5)	29 (8,5)	NA	39 (9,4)
RESPONSÁVEL PELA CRIANÇA				
Pais	51 (68,9)	171 (50,0)	NA	222 (53,4)
Familiares	23 (31,1)	166 (48,5)	NA	189 (45,4)
Outros	0 (0)	5 (1,5)	NA	5 (1,2)
ESCOLARIDADE DO RESPONSÁVEL PELA CRIANÇA				
Não Alfabetizada	1 (1,4)	18 (5,3)	NA	19 (4,6)
Ensino Primário	23 (31,1)	111 (32,5)	NA	134 (32,2)
Ensino Secundário	47 (63,6)	198 (57,9)	NA	245 (58,9)
Licenciatura	3 (4,1)	15 (4,4)	NA	18 (4,3)

N – Número total de indivíduos em cada grupo estudado; n- Número de amostra; % - Percentagem das ocorrências; NA – Não aplicável

Quadro 9 – Situação de saneamento básico do ambiente dos grupos estudados

	Jardim Infantil N= 74 n (%)	Escola Primária N=342 n (%)	Professores N=17 n (%)	Total das ocorrências N=433 n (%)
ÁGUA USADA PARA BEBER				
Canalizada	73 (98,6)	341 (99,7)	17 (100)	431 (99,5)
Poço	1 (1,4)	1 (0,3)	0 (0)	2 (0,5)
DESTINO DO ESGOTO				
Céu aberto	21 (28,4)	144 (33,3)	2 (11,8)	137 (31,6)
Fossa	26 (35,1)	138 (40,4)	11 (64,7)	175 (40,4)
Rede de Esgoto	27 (36,5)	90 (26,3)	4 (23,5)	121 (27,9)
DESTINO DO LIXO				
Joga ao redor da casa	18 (24,3)	120 (35,1)	3 (17,6)	141 (32,6)
Queima	2 (2,7)	4 (1,2)	0 (0)	6 (1,4)
Sistema de colheita	54 (73,0)	218 (63,7)	14 (82,4)	286 (66,1)
HABITOS DA DEFECAÇÃO				
Na rua	47 (63,5)	209 (61,1)	0 (0)	256 (59,1)
Na casa de banho	14 (18,9)	23 (6,7)	15 (88,2)	52 (12,0)
Rua e casa de banho	13 (17,6)	110 (32,2)	2 (11,8)	125 (28,9)
CONVIVÊNCIA COM ANIMAIS				
Sim	64 (13,5)	308 (90,1)	14 (9,9)	386 (89,1)
Não	10 (86,5)	34 (7,9)	3 (0,7)	47 (10,9)
LAVA AS MÃOS DEPOIS DA DEFECAÇÃO				
Sim	0 (0)	0 (0)	11 (64,7)	11 (2,5)
Às Vezes	74 (100)	342 (100)	6 (35,3)	422 (97,5)

N – Número total de indivíduos em cada grupo estudado; n- Número de amostra; % - Percentagem das ocorrências

Dos participantes no estudo 59,1% (256/433) têm o hábito de defecar na rua. Dos 12,0% (52/433) indivíduos que relataram usar casa de banho 88,2% (15/17) eram professores. Quanto às crianças, verificou-se menor percentagem das crianças do jardim infantil e da escola primária a utilizar a casa de banho para defecar, 18,9% (14/74) e 6,7% (23/342), respetivamente e 28,9% (125/433) disseram que defecavam ao ar livre e na casa de banho. A convivência com algum tipo de animal doméstico foi observada em 89,1% (386/433) dos participantes e 10,9% (47/433) não tinham nenhum animal doméstico em casa. Depois da defecação 97,5% (422/433) dos participantes lavam as mãos às vezes e apenas 2,5% (11/433) lavam as mãos depois de defecar (Quadro 9).

3.2. Diagnóstico parasitológicos e de biologia molecular

As técnicas parasitológicas e de biologia molecular aplicadas às amostras de fezes em estudo revelou que 70% dos participantes estavam infetados com algum parasita intestinal (Gráfico 3), sendo que as crianças do jardim infantil tiveram a maior frequência de parasitas 71,6% (53/74) ($p=0,03$), seguida da escola primária com 71,1 (243/342), e por último os professores, cozinheiras e pessoal administrativo com 41,2% (7/17) (Gráfico 4).

O gráfico 5 apresenta os resultados dos métodos de pesquisa dos parasitas, usados neste estudo, sendo que pelo método de concentração seguida pela observação microscópica foi detetado *E. coli*, *B. hominis*, *H. nana*, *A. lumbricoides* e *E. vermicularis*, pelos métodos de PCR detetou-se *Cryptosporidium* spp. (Figura 10) e *E. bienersi* (Figura 11), e pelos dois métodos detetou-se *G. duodenalis* (Figuras 9).

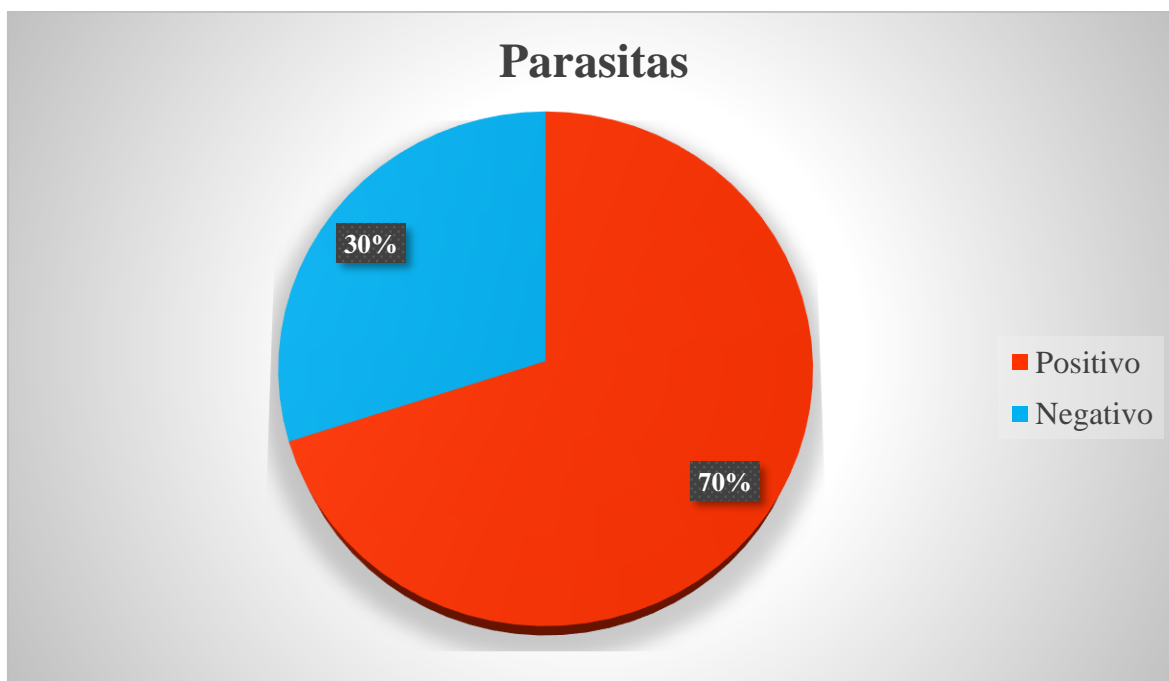


Gráfico 3 – Presença de enteroparasitas observada nos 433 participantes no estudo

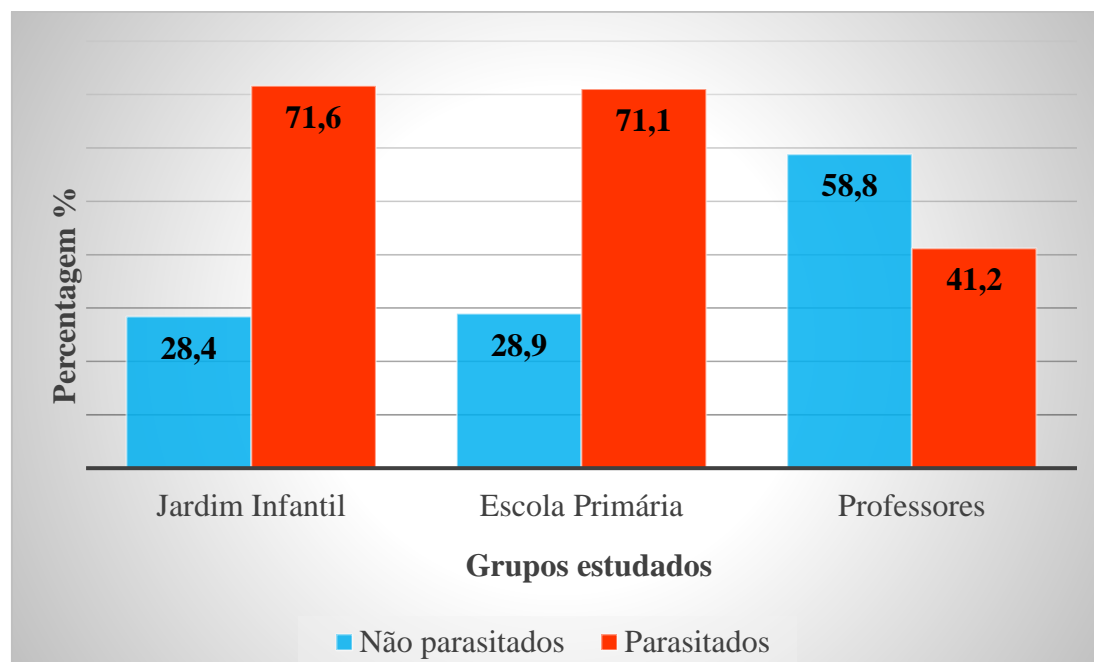


Gráfico 4 – Frequência de enteroparasitoses nos alunos, professores e pessoal administrativo da Escola Primária de Salina

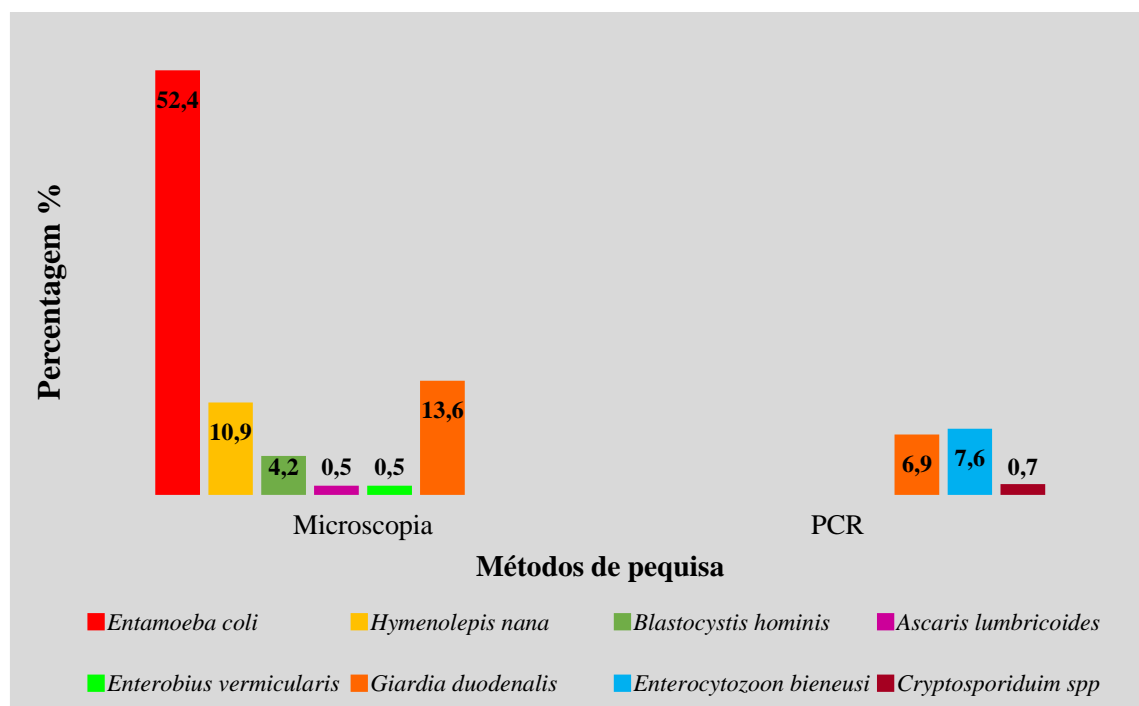


Gráfico 5 – Frequência de parasitas intestinais observada pelos métodos de diagnóstico utilizados (microscopia ótica e PCR)

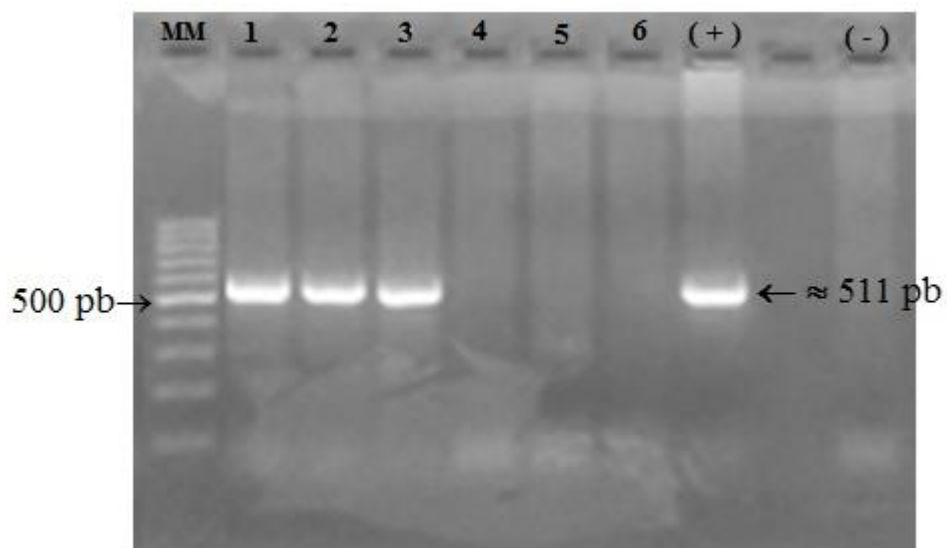


Figura 9 – Fotografia do gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene β -giardina de *G. duodenalis* por *nested*-PCR. Amostras submetidas a amplificação: Poços 1 a 6, produto de PCR isolado de *G. duodenalis*; Poço 7 - (+) controlo positivo, poço 9 - (-) controlo negativo; MM, Marcador de massa molecular de 100pb.

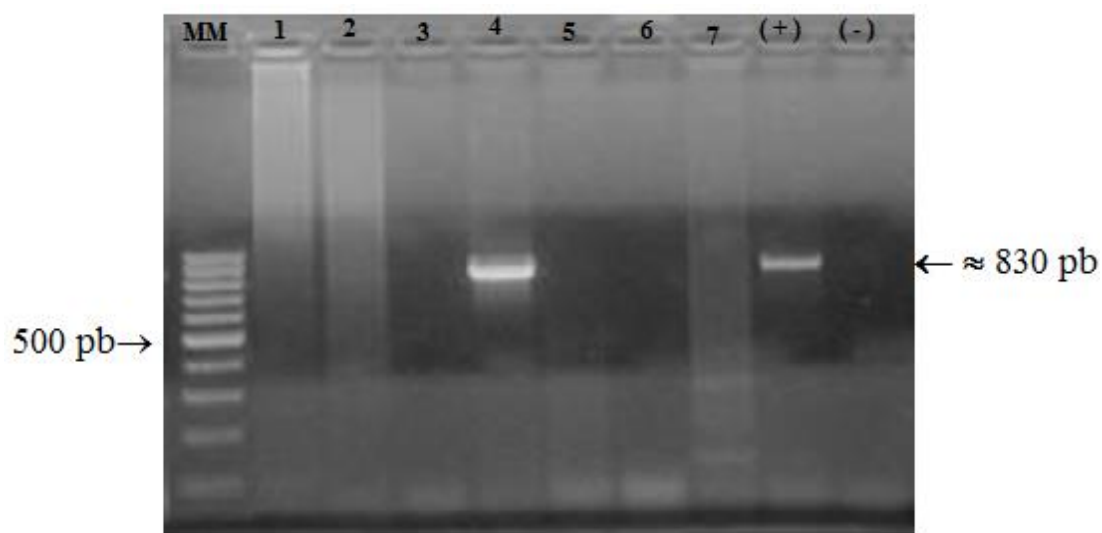


Figura 10 - Fotografia do gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene SSU rRNA por *nested*-PCR. Amostras submetidas a amplificação: Poços 1 a 7, produto de PCR isolado de *Cryptosporidium* spp.; Poço 8: (+) controlo positivo, poço 9: (-) controlo negativo; MM, Marcador de massa molecular de 100pb.

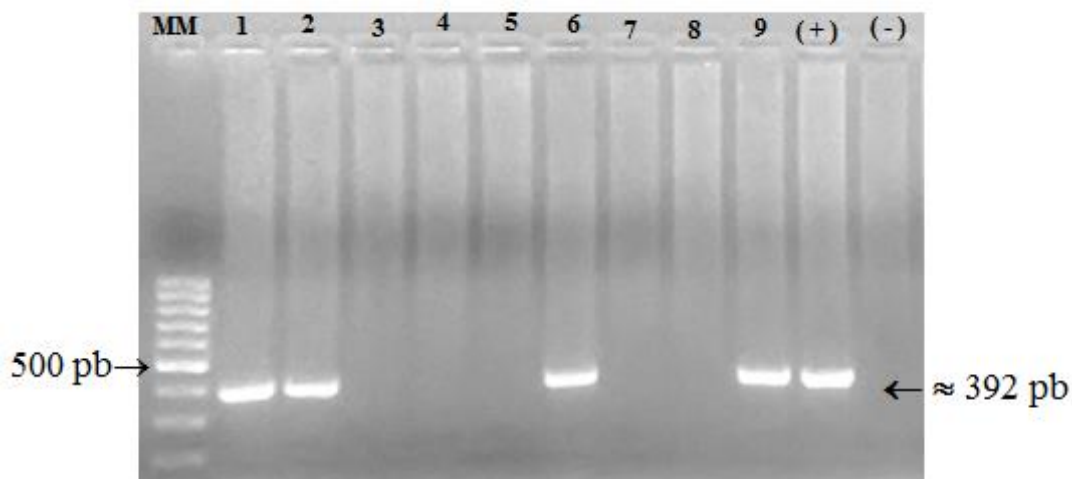


Figura 11 - Fotografia do gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene ITS rRNA por *nested*-PCR. Amostras submetidas a amplificação: Poços 1 a 9, produto de PCR isolado de *E. bieneusi*; Poço 10: (+) controlo positivo, poço 11: (-) controlo negativo; MM, Marcador de massa molecular de 100pb.

No total da população estudada foram identificados 66,7% (289/433) de casos de infecção por protozoários. De entre estes indivíduos infetados por protozoários a maioria 71,6% (53/74) eram crianças de jardim infantil, 67,3% (230/342) eram crianças da escola primária e 35,3% (6/17) eram professores, cozinheiras e pessoal administrativo. Em relação à frequência de protozoários encontrada entre as crianças do jardim infantil, crianças da escola primária e os professores observou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,015$). O protozoário mais frequente foi *E. coli* com 52,4% (227/433) das ocorrências, sendo que destes 185/227 (54,1%) ($p=0,363$) eram crianças da escola primária. A frequência de helmintas neste estudo foi de 11,3% (49/433) e o helminta mais frequente foi *H. nana* com 10,9% (47/433) das ocorrências e o grupo mais afetado foram as crianças do jardim infantil com 12,2% (9/74) ($p=0,329$) (Quadro 10). Observou-se maior frequência de infeções por protozoários intestinais em relação a às infeções por helmintas na população total estudada, sendo que esta associação foi significativa ($p=0,015$). Relativamente aos parasitas, após a análise parasitológica e por PCR das amostras de fezes detetou-se a ocorrência de oito parasitas distintos (*E. coli*, *G. duodenalis*, *B. hominis*, *Cryptosporidium* spp., *E. bieneusi*, *H. nana*, *A. lumbricoides* e *E. vermicularis*) sendo que *E. coli* foi o parasita com maior frequência 52,4%, seguido de *G. duodenalis* com 16,6%, *H. nana* com 10,9%, *E. bieneusi* 7,6%, *Blastocystis hominis* 4,2%, *Cryptosporidium* spp. 0,7%, e *A. lumbricoides* e *E. vermicularis*, ambos com 0,5% cada (Gráfico 6 e Quadro 10).

Foi identificada maior frequência de *G. duodenalis* (25,7%), *E. bieneusi* (14,9%) e *B. hominis* (9,5%) nas crianças do jardim infantil, relativamente às amostras estudadas, verificando-se que estas diferenças são estatisticamente significativas (Quadro 10)

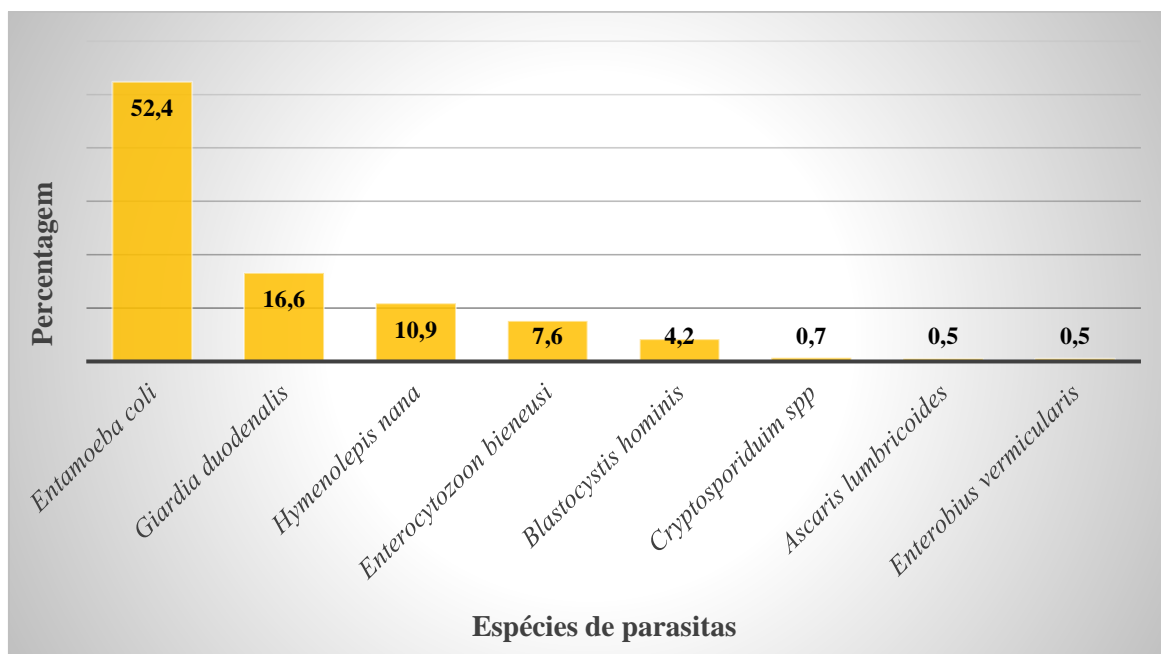


Gráfico 6 – Percentagem de parasitas encontrada nas amostras biológicas em estudo.

Quadro 10 – Frequência de parasitas identificados no estudo, de acordo com os grupos estudados

	Jardim Infantil N= 74 n (%)	Escola Primária N=342 n (%)	Professores N=17 n (%)	Total das ocorrências N=433 n (%)	p
PROTOZOÁRIOS	53 (71,6)	230 (67,3)	6 (35,3)	289 (66,7)	0,015
<i>Entamoeba coli</i>	35 (47,3)	185 (54,1)	7 (41,2)	227 (52,4)	0,363
<i>Giardia duodenalis</i>	19 (25,7)	53 (15,5)	0 (0)	72 (16,6)	0,018
<i>Blastocystis hominis</i>	7 (9,5)	10 (2,9)	1 (5,9)	18 (4,2)	0,036
<i>Cryptosporidium spp</i>	0 (0)	3 (0,9)	0 (0)	3 (0,7)	0,669
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	11 (14,9)	22 (6,4)	0 (0)	33 (7,6)	0,022
HELMINTAS	9 (12,2)	40 (11,7)	0 (0)	49 (11,3)	0,321
<i>Hymenolepis nana</i>	9 (12,2)	38 (11,1)	0 (0)	47 (10,9)	0,329
<i>Ascaris lumbricoides</i>	0 (0)	2 (0,6)	0 (0)	2 (0,5)	0,765
<i>Enterobius vermicularis</i>	0 (0)	2 (0,6)	0 (0)	2 (0,5)	0,765

N – Número total de indivíduos em cada grupo estudado; n- Número de amostras; % - Percentagem das ocorrências

Segundo as informações fornecidas pelos responsáveis das crianças e pelos professores, através do questionário aplicado no dia da recolha das amostras de fezes quanto à sintomatologia, 90,5% (392/433) dos participantes apresentavam sintomas como febre, diarreia, dor abdominal, vômitos e dor de cabeça à menos de 1 ano, dos 392 indivíduos que apresentam alguns sintomas, 273/303 (69,6%) estavam parasitados por algum parasita. Entre os sintomas referidos o mais frequente foi a dor abdominal observada em 77,1% (374/433) dos participantes e destes 68,9% (230/374) estavam parasitados por algum tipo de parasita. Das associações exploradas quanto ao nível de dependência ou não das variáveis a associação estatística não se revelou significativa (Quadro 11).

Quadro 11 – Sintomatologia apresentada pela população estudada na presença ou ausência de parasitas

	Parasita N=433 n (%)		Total das ocorrências N=433 (n (%))	p
	Sim	Não		
SINTOMAS				
Sim	273 (69,6)	119 (30,4)	392 (90,5)	0,126
Não	30 (7,3,2)	11 (26,8)	41 (9,5)	
FEBRE				
Sim	226 (69,8)	98 (30,2)	324 (74,8)	0,861
Não	77 (70,6)	32 (29,4)	109 (25,2)	
DIARREIA				
Sim	169 (69,5)	74 (30,5)	243 (56,1)	0,825
Não	134 (70,5)	56 (29,5)	190 (43,9)	
DOR ABDOMINAL				
Sim	230 (68,9)	104 (31,1)	374 (77,1)	0,353
Não	73 (73,7)	26 (26,3)	99 (22,9)	
VÓMITOS				
Sim	157 (68,3)	73 (31,7)	230 (53,1)	0,407
Não	146 (71,9)	57 (28,1)	203 (46,9)	
DOR DE CABEÇA				
Sim	181 (67,5)	87 (32,5)	268 (61,9)	0,158
Não	122 (73,9)	43 (26,1)	165 (38,1)	

N – Número total de parasitas encontrado no estudo; n- Número de amostras; % - percentagem das ocorrências

No gráfico 7 estão representados os valores referentes ao grau de escolaridade dos responsáveis pelas crianças quanto à presença ou ausência dos parasitas. Dos responsáveis pelas crianças com parasitas 40,9% tinham o ensino secundário, completo ou incompleto, e 18,0% dos responsáveis das crianças não parasitadas referiram ter o ensino secundário completo ou incompleto. Uma menor percentagem dos responsáveis (4,3%) estava a frequentar ou já tinha terminado o ensino universitário e destes 2,9% eram os responsáveis por crianças parasitadas. O analfabetismo observou-se em 4,6% dos responsáveis pelas crianças e destes 3,6% tinham crianças parasitadas (Gráfico 7).

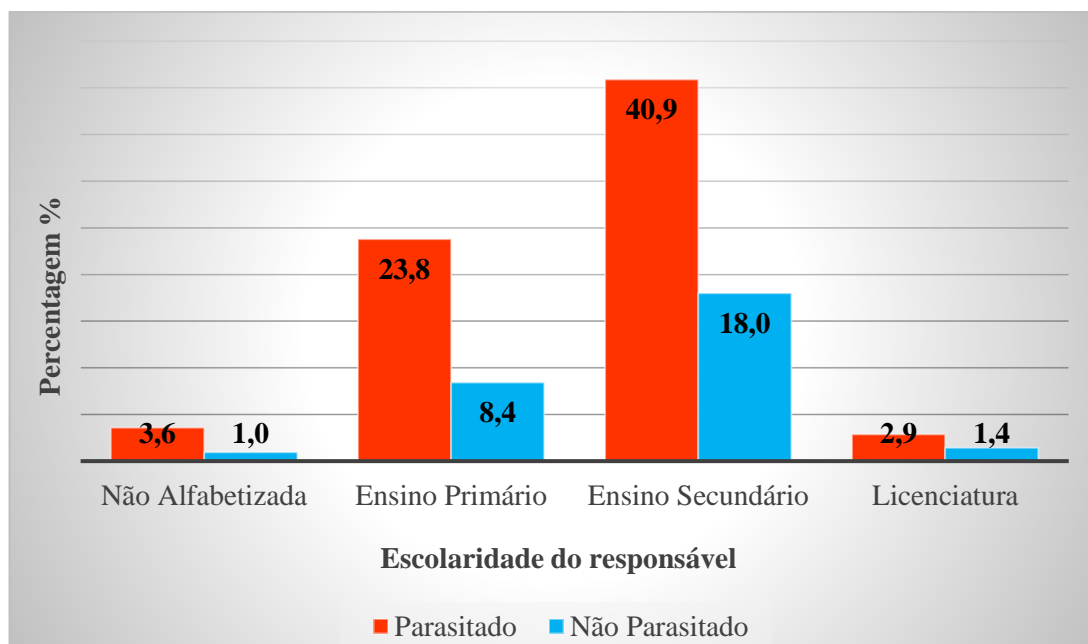


Gráfico 7 – Grau de escolaridade dos responsáveis pelas crianças parasitadas e não parasitadas

3.3. Fatores sociodemográficos e ambientais

Os locais frequentados pelas crianças podem favorecer ou não a ocorrência de parasitas. Com base nesta informação aplicou-se o questionário junto dos pais e encarregados de educação das crianças como forma de entender como os fatores sociodemográfico e ambientais influenciam a transmissão dos parasitas em Salina (Quadro 12).

A origem da água usada para beber não foi esclarecedora, visto que a maioria, 99,5% (431/433), dos alunos tinha em suas casas água canalizada, e destes 69,8% apresentavam algum tipo de infecção parasitária.

O destino dos dejetos é muito importante uma vez que são um dos principais meios de transmissão dos parasitas. Neste estudo 27,9% (121/433) dos participantes tinham as suas casas com ligação à rede de esgotos, 40,5% (175/433) tinham as suas casas ligadas á fossa séptica, e 31,6% (137/433) das casas dos participantes não apresentavam nenhum tipo de ligação sanitária e os dejetos vão parar diretamente ao ambiente. A maior frequência de parasitas observou-se nas crianças cujas suas casas não tinha nenhum tipo de ligação à rede de esgotos (75,2%) ($p=0,248$). Dos 40,5% (175/433) que vivem em casas com ligação a fossa séptica, 68,6% (120/175) tinham algum tipo de parasita; dos 27,9% (121/433) que

tinham as suas casas ligadas à rede pública de esgoto, 66,1% (80/121) tinham algum tipo de parasita.

Em 66,1% (286/433) ($p=0,622$) das casas dos indivíduos que participaram deste estudo o lixo é recolhido. Destas crianças 68,5% (196/286) tiveram pelo menos uma espécie de parasita. Em 32,6% (141/433) dos indivíduos que participaram deste estudo o lixo é lançado para a rua ou perto de alguma habitação, sendo que destas crianças 73,0% (103/141) apresentaram parasitas. Em apenas 1,4% (6/433) das casas dos indivíduos que participaram deste estudo queimava-se o lixo.

Dos participantes em estudo, 59,1% (256/433) defecavam ao ar livre e destas 70,3% (180/256) estavam parasitadas; 28,9% (125/433) defecavam na casa de banho e na rua e destas 74,4% (93/125) estavam parasitadas; e 12,0% (52/433) das crianças defecavam na casa de banho.

A convivência com animais domésticos foi observada em 89,1% ($p=0,764$) (386/433) dos participantes sendo que 70,2% (271/386) estavam parasitados por alguma espécie de parasita. Das associações exploradas nenhuma foi significativa (Quadro 12).

Os helmintas encontrados neste estudo, *H. nana*, *A. lumbricoides* e *E. vermicularis*, surgem todos na população que bebe água canalizada. O mais prevalente, *H. nana*, apresenta maior frequência nos indivíduos que têm esgoto a céu aberto, nos que têm sistema de colheita de lixo e nos que têm o hábito de defecar na rua, no entanto não se encontraram associações significativas (Quadro 13).

De acordo com a caracterização dos fatores sociodemográficos (água usada para beber, destino do esgoto, destino do lixo, defecação da criança e convivência com animais), no grupo dos protozoários identificados observou-se maior frequência de parasitas nos participantes que bebiam água da rede pública, *B. hominis* (100%), *Cryptosporidium spp.* (100%), *E. coli* (99,6%), *G. duodenalis* (98,6%), *E. bienersi* (97,0%). Observou-se associação significativa entre o número de casos de infecção por *E. bienersi* e a ingestão de água canalizada ($p = 0.024$) (Quadro 14).

Quadro 12 – Frequência de parasitas intestinais de acordo com os fatores sociodemográficos

	Parasita N=433 n (%)		Total	<i>p</i>
	Sim	Não		
ÁGUA USADA PARA BEBER				
Canalizada	301 (69,8)	130 (30,2)	431(99,5)	0,353
Poço	2 (100)	0 (0)	2 (0,5)	
DESTINO DO ESGOTO				
Céu aberto	103 (75,2)	34 (24,8)	137 (31,6)	0,248
Fossa	120 (68,6)	55 (31,4)	175 (40,4)	
Rede de Esgoto	80 (66,1)	41 (33,9)	121 (28,0)	
DESTINO DO LIXO				
Joga ao redor da casa	103 (73,0)	38 (27,0)	141 (32,6)	0,622
Queima	4 (66,7)	2 (33,3)	6 (1,4)	
Sistema de colheita	196 (68,5)	90 (31,5)	286 (66,1)	
HÁBITOS DE DEFECAÇÃO				
Na rua	180 (70,3)	76 (29,7)	256 (59,1)	0,086
Na casa de banho	30 (57,7)	22 (42,3)	52 (12,0)	
Rua e casa de banho	93 (74,4)	32 (25,6)	125 (28,9)	
CONVIVÊNCIA COM ANIMAIS				
Sim	271 (70,2)	115 (29,8)	386 (89,1)	0,764
Não	32 (68,1)	15 (31,9)	47 (10,)	

N – Número total de parasitas encontrado no estudo n- Número de amostras; % - percentagem das ocorrências

Quadro 13- Ocorrência de Parasitas do Grupo dos Helmintas nos participantes que frequentavam a escola primária de Salina e relação com os fatores sociodemográficos em estudo

	<i>Hymenolepis nana</i> N=47 n (%)	<i>P</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i> N=2 n (%)	<i>p</i>	<i>Enterobius vermicularis</i> N=2 n (%)	<i>p</i>
ÁGUA USADA PARA BEBER						
Canalizada	47 (100)	0,621	2 (100)	0,923	2 (100)	0,923
Poço	0 (0)		0(0)		0 (0)	
DESTINO DO ESGOTO						
Céu aberto	17 (36,2)	0,626	2 (100)	0,114	2 (100)	0,114
Fossa	16 (34,0)		0 (0)		0 (0)	
Rede de Esgoto	14 (29,8)		0 (0)		0 (0)	
DESTINO DO LIXO						
Joga ao redor da casa	21 (44,7) 1 (2,1)	0,142	2 (100) 0 (0)	0,125	1 (50,0) 0 (0)	0,863
Queima	25 (53,2)		0 (0)		1 (50,0)	
Sistema de colheita						
HÁBITOS DA DEFECAÇÃO						
Na rua	26(55,3)	0,208	0 (0)	0,84	1 (50,0)	0,748
Na casa de banho	3 (6,4)		0 (0)		0 (0)	
Rua e casa de banho	18 (38,3)		2 (100)		1 (50,0)	
CONVIVÊNCIA COM ANIMAIS						
Sim	42 (89,4)	0,960	1 (50,0)	0,074	1 (50,0)	0,074
Não	5 (10,6)		1 (50,0)		1 (50,0)	

N – Número total de parasitas encontrado no estudo; n- Número de amostras; % - Percentagem das ocorrências

Quadro 14 – Ocorrência de Parasitas do grupo dos Protozoários nos participantes que frequentavam a escola primária de Salina e relação com os fatores sociodemográficos em estudo

	<i>Entamoeba coli</i> N=227 n (%)	<i>p</i>	<i>Giardia duodenalis</i> N=72 n (%)	<i>p</i>	<i>Blastocystis hominis</i> N=18 n (%)	<i>p</i>	<i>Cryptosporidium spp</i> N=3 n (%)	<i>p</i>	<i>Enterocytozoon bieneusi</i> N=33 n (%)	<i>p</i>
ÁGUA USADA PARA BEBER										
Canalizada	226 (99,6)	0,945	71 (98,6)	0,204	18 (100)	0,768	3 (100)	0,90	32 (97,0)	0,024
Poço	1 (0,4)		1 (1,4)		0 (0)		0 (0)		1 (3,0)	
DESTINO DO ESGOTO										
Céu aberto	75 (33,0)	0,281	27 (37,5)	0,358	5 (27,8)	0,136	0 (0)	0,47	9 (27,3)	0,742
Fossa	96 (42,3)		24 (33,3)		11 (61,1)		2 (66,7)		13 (39,4)	
Rede de Esgoto	56 (24,7)		21 (29,2)		2 (11,1)		1 (33,3)		11 (33,3)	
DESTINO DO LIXO										
Joga ao redor da casa	72 (31,7)	0,915	27 (37,5)	0,305	8 (44,4)	0,500	1 (33,3)	0,97	13 (39,4)	0,450
Queima	3 (1,3)		2 (2,8)		0 (0)		0 (0)		1 (3,0)	
Sistema de colheita	152 (67,0)		43 (59,7)		10 (55,6)		2 (66,7)		19 (57,6)	
HÁBITOS DA DEFECAÇÃO										
Na rua	134 (59,0)	0,360	42 (58,3)	0,927	11 (61,1)	0,726	2 (66,7)	0,36	18 (54,5)	0,800
Na casa de banho	23 (10,1)		8 (11,1)		3 (16,7)		1 (33,3)		5 (15,2)	
Rua e casa de banho	70 (30,8)		22 (30,6)		4 (22,2)		0 (0)		10 (30,3)	
CONVIVÊNCIA COM ANIMAIS										
Sim	202 (89,0)	0,911	61 (84,7)	0,186	14 (77,8)	0,113	2 (66,7)	0,209	29 (87,9)	0,808
Não	25 (11,0)		11 (15,3)		4 (22,2)		1 (33,3)		4 (12,1)	

N – Número total de parasitas encontrado no estudo; n- Número de amostras; % - Percentagem das ocorrências

3.4. Caracterização do estado nutricional das crianças

Segundo os resultados obtidos após exames sanguíneos feitos às crianças, para avaliar os níveis de hemoglobina, 22,4% delas apresentavam anemia (concentração de hemoglobina <11g/dl para crianças dos 6 aos 59 meses, <11,5g/dl para crianças dos 5 aos 11 anos e <12,0g/dl para crianças dos 12 aos 14 anos) e 77,6% não apresentavam anemia, os níveis de hemoglobina estavam normais (Gráfico 8).

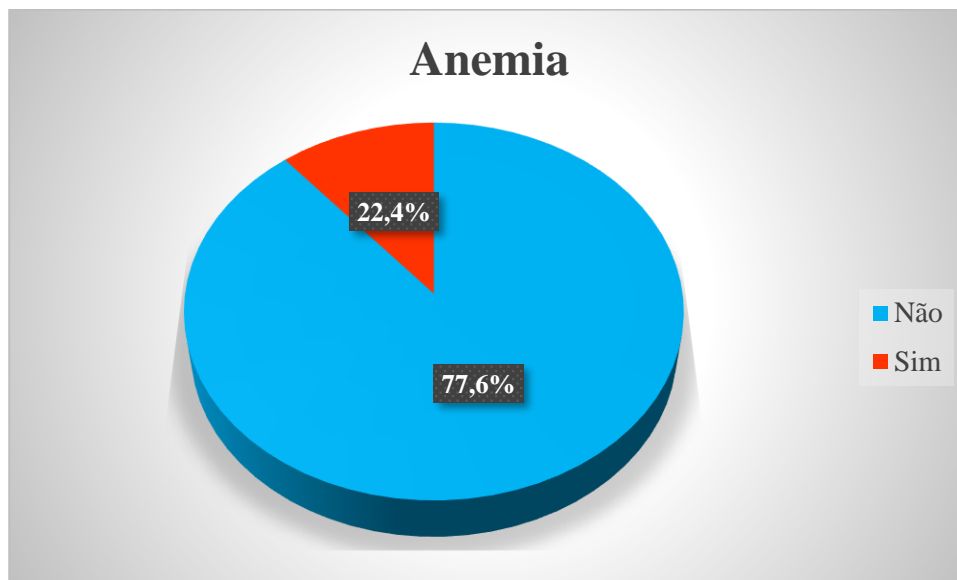


Gráfico 8 – Percentagem das crianças com e sem anemia no estudo

Conforme os dados apresentados no quadro 15, verificou-se que 22,4% (93/433) das crianças com anemia 71% (66/93) ($p=0,964$) apresentava pelo menos uma espécie de parasita e 29% (27/93) não apresentavam nenhuma espécie de parasita. Entre essas duas variáveis, anemia e presença de parasitas, não se observou associação estatisticamente significativa, ou seja, essas duas variáveis são independentes.

Avaliando o estado nutricional das crianças observou-se que quanto ao índice altura para a idade 88,2% (82/93) ($p=0,868$) das crianças que tinham anemia apresentavam desenvolvimento menor que 85%. Quanto ao índice peso para idade 83,9% (78/93) ($p=0,876$) das crianças que tinham anemia estavam com o desenvolvimento menor que 60% (Quadro 15).

O modelo de regressão logística foi feito usando a variável dependente anemia e covariáveis, parasitas, altura para a idade e peso para a idade, (a variável parasita foi categorizada em sim e não, a altura para a idade foi categorizada em pouco

desenvolvido e desenvolvimento normal e o peso para a idade foi categorizada em baixo peso e peso normal), mas das associações feitas não se observou diferença estatisticamente significativa.

Quadro 15 – Relação entre anemia, presença de parasitas, altura e peso para a idade nas crianças em idade escolar

	Anemia N=93 n (%)		p
	Sim	Não	
PARASITAS			
Sim	66 (71,0)	230 (71,2)	0,964
Não	27 (29,0)	93 (28,8)	
ALTURA PARA A IDADE			
<85%	82 (88,2)	280 (86,7)	0,868
85 – 94,9%	7 (7,5)	30 (9,3)	
≥95%	4 (4,3)	13 (4,0)	
PESO PARA A IDADE			
<60%	78 (83,9)	267 (82,7)	0,876
60 – 74,9%	6 (6,5)	26 (8,0)	
≥75%	9 (9,7)	30 (9,3)	

N – Número total de crianças com anemia encontrado no estudo; n- Número de amostras; % - Percentagem das ocorrências

A ocorrência de anemia foi mais acentuada nas crianças que estavam parasitadas por algum tipo de helminta encontrado no estudo (26,5%), em relação às crianças que estavam parasitadas apenas por protozoários (23,0%). Em relação ao helminta mais frequente no estudo, *H. nana*, 27,7% (13/47) dos que estavam parasitados apresentavam anemia. Das crianças infetadas por *E. bieneusi* 13 (39,4) tinham anemia; das crianças infectadas com *B. hominis* 5 (29,4%) apresentavam anemia; das que estavam infetadas por *G. duodenalis* 16 (22,2%) tinham anemia; das crianças infetadas por *E. coli* 46 (20,9%) tinham anemia (Quadro 16).

Quadro 16 - Parasitas identificados no estudo, de acordo com a ocorrência de anemia nas crianças

	Anemia		Total	p
	N=93		n (%)	
	n (%)			
	Sim	Não		
PROTOZOÁRIOS	65 (23,0)	218 (77,0)	283 (100)	0,662
<i>Entamoeba coli</i>	46 (20,9)	174 (79,1)	220 (100)	0,453
<i>Giardia duodenalis</i>	16 (22,2)	56 (77,8)	72 (100)	0,976
<i>Blastocystis hominis</i>	5 (29,4)	12 (70,6)	17 (100)	0,476
<i>Cryptosporidium spp</i>	0 (0)	3 (100)	3 (100)	0,351
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	13 (39,4)	20 (60,6)	33 (100)	0,014
HELMINTAS	13 (26,5)	36 (73,5)	49 (100)	0,321
<i>Hymenolepis nana</i>	13 (27,7)	34 (72,3)	47 (100)	0,354
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100)	0,347
<i>Enterobius vermicularis</i>	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100)	0,347

N – Número total de crianças com anemia encontrado no estudo; n- Número de amostras; % - Percentagem das ocorrências

Quanto ao número de parasitas apresentado pelas crianças 4,8% das que tinham anemia apresentavam somente uma espécie de parasita, monoparasitismo, 3,4% que tinham anemia apresentavam dois ou mais tipos de espécies de parasitas diferentes, poliparasitismo, e 2,9% não possuíam nenhum tipo de parasita (Gráfico 9).

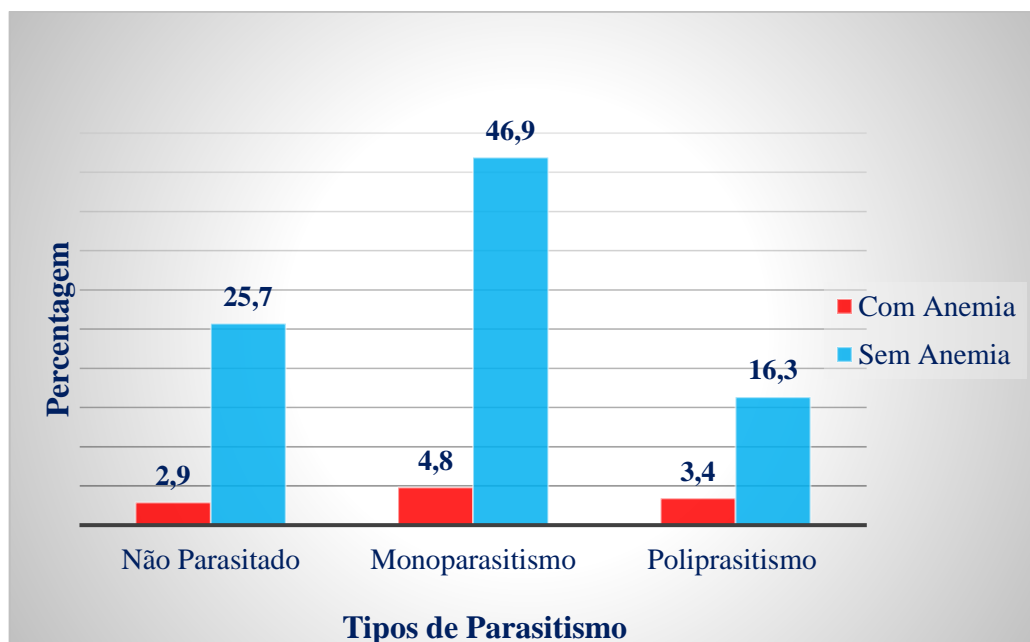


Gráfico 9 – Ocorrência de anemia entre as crianças não parasitadas, com um parasita e com poliparasitismo

CAPITULO IV:

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

4. DISCUSSÃO

4.1. Caracterização demográfica

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos alcançados ao longo dos anos na saúde, embora a maioria das infecções parasitárias sejam assintomáticas, as enteroparasitoses continuam a ser um problema importante de saúde pública e atuam como indicador do desenvolvimento socioeconómico de um país. Em Cabo Verde as infecções intestinais provocadas por parasitas afetam cada vez mais as crianças em idade escolar, com maior incidência nas comunidades em que as condições socioeconómicas e ambientais favorecem a sua ocorrência.

O presente estudo foi realizado na Escola Primária de Salina em Pedra Badejo, Ilha de Santiago, Cabo Verde, durante o ano letivo 2015/2016 e teve a participação de 433 pessoas. Destes 74 eram crianças que frequentavam o jardim infantil, 342 crianças frequentavam a escola básica do 1º ao 6º ano de escolaridade e 17 eram adultos funcionários da escola, professores, cozinheiras e pessoal administrativo. As idades das crianças participantes variaram entre os 2 anos e os 14 anos e o sexo masculino teve maior prevalência 52,7% em relação ao sexo feminino 47,3%.

O principal objetivo deste trabalho foi estimar a prevalência de enteroparasitoses em todos os participantes, determinar a percentagem de casos de anemia nas crianças em idade escolar e quais os potenciais fatores de risco associados à ocorrência das enteroparasitoses.

Embora as enteroparasitoses possam ocorrer em indivíduos de todas as idades, a vulnerabilidade é maior nas crianças em idade escolar, principalmente do jardim infantil e escola básica. Segundo WHO (2006), aproximadamente 3,5 bilhões de pessoas estão infetadas por alguma espécie de parasita intestinal em todo mundo, tendo em conta que cerca de 450 milhões estão doentes. A maioria são crianças residentes nas áreas tropicais de países em desenvolvimento. Essa maior vulnerabilidade deve-se ao facto de as crianças apresentarem um sistema imunológico imaturo, comportamentos de riscos e possuírem pouca informação a respeito dos princípios básicos de higiene. Dados da WHO (2006) mostraram que as percentagens de infeção parasitária nas crianças, podem se consideradas um fator indicativo das más condições sanitárias da comunidade onde vivem. Os altos índices da morbilidade fazem com que

as doenças parasitárias continuam sendo um dos principais motivos da procura de assistência médica na infância.

4.2. Diagnóstico Parasitológico e de Biologia Molecular

O parasita quando está presente no seu hospedeiro adquire estratégias que garantam a sua sobrevivência. Essa associação parasita-hospedeiro tende para um equilíbrio, pois a morte do hospedeiro é prejudicial para o parasita (Costa et al., 1999).

Os resultados do estudo indicaram a ocorrência de vários parasitas intestinais de importância médica entre as crianças e os adultos, tendo a percentagem global sido de 70%. Nos grupos de crianças do jardim infantil o valor foi de 71,6% e na escola primária foi de 71,1%, resultado esse superior aos valores encontrados por outros autores em estudos similares: 52,2% na província de Lobata – República Democrática de São Tomé e Príncipe (Lobo et al., 2014), 44,2% no Lubango – Angola (Oliveira, 2015), 34,2% no Noroeste da Etiópia (Gelaw et al., 2013). Por outro lado, essa prevalência é baixa em relação a resultados apresentados por outros autores: 81% no Sul da Etiópia (Abossie & Seid, 2014), 82,6% no Burquina Faso (Erismann et al., 2017). Segundo Gelaw et al. (2013) as variações observadas nos valores das prevalências podem dever-se as diferentes metodologias utilizadas na pesquisa dos parasitas, condições climáticas, saneamento básico do meio e situação económica e educacional dos pais. A transmissão de parasitas intestinais depende da presença de indivíduos infetados, da situação sociodemográfica e comportamental da população (Abossie & Seid, 2014).

Neste estudo, a frequência tão alta de enteroparasitoses verificada nas crianças, mais uma vez expressa a vulnerabilidade das crianças em idade escolar à infeção por parasitas intestinais em Cabo Verde, apesar dos seus encarregados de educação terem algum conhecimento quanto aos princípios básicos de higiene, não os colocando em prática no dia-a-dia. De acordo com Patz et al. (2000), as doenças parasitárias são influenciadas pelas mudanças ambientais e possuem uma associação íntima com o comportamento humano.

Neste estudo foram utilizados dois métodos distintos para fazer a pesquisa dos parasitas, o método de pesquisa por microscopia ótica que é pouco sensível e específico, e o método molecular que apresenta resultados mais específicos e sensíveis.

A microscopia é considerada uma técnica padrão para o diagnóstico laboratorial das enteroparasitoses, no entanto é pouco sensível e os seus resultados depende muito da experiência do investigador em reconhecer os microrganismos. Para melhorar e aumentar a sensibilidade de identificação dos parasitas recorreu-se a técnicas de concentração, bem como a técnicas de coloração, para facilitar a identificação dos ovos, quistos e trofozoítos dos parasitas. Para que os resultados fossem mais específicos e consistentes foi necessário a utilização de métodos adicionais de biologia molecular.

A técnica de PCR é capaz de detetar um único fragmento de DNA numa amostra. A deteção das sequências específicas de DNA por PCR tem sido extremamente importante para a análise genética e para o diagnóstico de várias doenças infecciosas (Abath et al., 2006).

Método molecular, como a *nested*-PCR, foram aplicados para a deteção dos protozoários patogénicos, *Cryptosporidium* spp., *E. bieneusi* e *G. duodenalis*. Dentre os protozoários patogénicos o mais prevalente foi *G. duodenalis* com 16,6% das ocorrências, inferior à taxa encontrada no estudo feito na Etiópia (35,3%) com crianças de idade inferior a 14 anos (Ayalew D. et al, 2008), na Guiné-Bissau (34,7%) com crianças dos 4 aos 12 anos de idade (Steenhard N. et al 2009), no Egipto (34,6%) (Foronda P. et al 2008) e na Turquia (31,4%) com crianças de 1 aos 15 anos de idade (Balci Y. et al, 2009). O resultado foi superior à frequência encontrada na Costa do Marfim (13,9%), num estudo feita com crianças dos 6 aos 12 anos (Ouattara et al, 2010). As diferentes taxas apresentadas nestes estudos podem ser explicadas com base nos diferentes métodos utilizados para pesquisar o parasita. Os estudos epidemiológicos baseados apenas nos métodos morfológicos subestimam a prevalência real dos parasitas devido à sua baixa sensibilidade (Abreu et al, 2007), uma vez que a microscopia só por si não permite a diferenciação dos genótipos de *Giardia* visto que a morfologia do parasita é semelhante nos diferentes genótipos. Nesse sentido os métodos moleculares tornam-se relevantes pois permitem desenvolver técnicas para deteção dos parasitas e possíveis fontes da infeção (Cacciò & Ryan, 2008).

Através dos métodos parasitológicos e/ou moleculares foram encontradas oito espécies de parasitas intestinais distintas, sendo os mais frequentes *E. coli* com 52,4%,

G. duodenalis 17,3%, *H. nana* 10,9%, *E. bieneusi* 7,6% e *B. hominis* 2,3% e os menos frequentes, mas com muita importância médica, foram *Cryptosporidium* spp. 0,7%, e *A. lumbricoides* e *E. vermicularis*, ambos com 0,5%.

E. coli foi o protozoário mais frequente em todos os grupos de participantes estudados. Apesar de ser um protozoário comensal no intestino humano, não provocando quadros sintomáticos, é importante uma vez que a alta frequência encontrada indica um grau de contaminação fecal alto a que os participantes estão expostos, o que torna necessária a aplicação de medidas de controle capazes de neutralizar as vias de transmissão dos parasitas.

Recentemente, *B. hominis* foi considerado um parasita potencialmente patogénico (Stenzel & Boreham, 1996; Carrascosa et al., 1996; Andiran et al., 2006). As faixas etárias mais jovens da população apresentam maior risco de contrair a infeção e de desenvolver manifestações clínicas característicos duma doença parasitária, quando infetados por este parasita (Graczyk et al., 2005). No presente estudo, a frequência de identificação de *B. hominis* nas fezes dos participantes foi de 2,3%, o que mostrou ser substancialmente menor do que as percentagens encontradas noutros países, 40,7% nas Filipinas (Eleonor et al., 2004), 36,9% na Tailândia (Leelayoova et al., 2004), 32% no Paquistão (Yakoob et al., 2004), 29% na Turquia (Dogruman- Al et al., 2010) e 25% na Jordânia (Nimri, 1993). No presente estudo a frequência de *B. hominis* foi maior nas crianças do jardim infantil, em relação aos outros participante e esta associação foi significativa ($p=0,036$).

Para identificar o parasita, *G. duodenalis*, foram utilizados dois métodos distintos, microscopia ótica, com a qual se obteve uma frequência de 13,6% e PCR que detetou 6,9% de amostras positivas. A baixa percentagem encontrada na pesquisa feita por PCR, pode estar associado com a degradação das moléculas do DNA durante a extração ou em qualquer outro processamento do material genético, devido à presença de substâncias na amostra do DNA que reduzem ou até mesmo impedem, por completo, a correta amplificação da região alvo (Hanelt, et al, 1997; Radström et al., 2004). Ainda, esta baixa sensibilidade poderá ser ainda devido à presença de inibidores que afetam a atividade da Taq polimerase, os quais não foram removidos por completo após a extração do DNA (Gelanew, 2007), ou ainda devido à presença de número reduzido de parasitas nas amostras originando quantidades de DNA muito baixas, não

detetáveis no gel de agarose (Khairnar e Parija 2007; Fotedar, 2007). A infecção por *G. duodenalis* é considerada como uma das principais causas da diarreia não-viral nos países em desenvolvimento, e ainda é o mais frequente em indivíduos com queixas gastrointestinais (Hove et al., 2009). Estudos associam a infecção por *G. duodenalis* com as crianças em idade pré-escolar, especialmente nos países em desenvolvimento (Teixeira J. et al, 2007), o que comprovadamente aconteceu neste estudo. Dos dois grupos de crianças estudadas, jardim infantil e escola primária, a percentagem do parasita foi maior nas crianças do jardim infantil, 25,7%, do que das crianças na escola primária, 15,5%, tendo-se verificado uma associação significativa entre a presença de *G. duodenalis* nas amostras fecais e as crianças do jardim infantil em relação às crianças da escola primária e aos adultos ($p=0,018$). Em setembro de 2004, o programa Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas da OMS incluiu na sua lista a doença provocada pela *G. duodenalis*, giardíase, demonstrando a relevância epidemiológica desta infecção (Savioli et al., 2006), reforçando ainda mais a importância do parasita na saúde pública.

A epidemiologia dos microsporídeos continua com diversos aspetos por clarificar e os valores das prevalências descritas para estes parasitas, apresentam diferenças significativas nas diversas regiões do mundo. Infecções com *E. bienersi* em seres humanos têm ocorrido em todo o mundo, com percentagens de infecção variando de 1,4% a 78% (Matos et al., 2012). A ocorrência de *E. bienersi*, no estudo foi de 7,6%, semelhante a um estudo feito por Yang e colaboradores, que estudaram 225 crianças de várias idades (hospitalizadas, que frequentavam creche e escola primária), sintomáticas e assintomáticas, e que encontraram uma frequência de infecção de 7,5%. Noutro estudo feito na Nigéria envolvendo 53 crianças, das quais 43 apresentavam diarreia, a frequência de infecção encontrada foi de 9,3%. Diversos autores descrevem a infecção por *E. bienersi* nas crianças (a maioria seropositivas para VIH), com valores de frequência variados: Zimbabué até 50% (Gumbo et al. 1999b); Uganda - 32,9% (Tumwine et al. 2005); Tailândia – 14,9% (Wanachiwanawin et al. 2002); África do Sul - 4,5% (Samie et al. 2007) e Nigéria – 0,8% (Bretagne et al. 1993). As variações resultaram principalmente da idade dos indivíduos e do estado clínico e imunológico dos participantes, uma vez que comparando os resultados encontrado no presente estudo com os dos outros autores, as crianças que participaram neste estudo eram

consideradas saudáveis, em relação às crianças estudadas pelos outros autores. Apesar de *E. bieneusi* poder causar infecções sintomáticas e assintomáticas em indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes (Matos et al., 2012), é provável que no presente estudo a ocorrência do parasita esteja relacionada com a idade e estado imunológico das crianças, visto que se encontrou uma diferença significativa entre a ocorrência do parasita e a população estudada. A presença de *E. bieneusi* foi mais significativa nas fezes das crianças do jardim infantil em relação às crianças da escola primária e aos adultos ($p=0,018$). As crianças que estavam parasitadas tinham a idade entre 4 e 7 anos e a maior parte apresentava baixo peso. Um estudo realizado na cidade de Benin, Nigéria, encontrou uma associação significativa entre infecções por *E. bieneusi* e perda de peso em pessoas VIH positivas (Akinbo, 2012). Ao longo da última década, têm surgido evidências de que a infecção por *E. bieneusi* pode ocorrer em imunocompetentes portadores assintomáticos. O parasita foi isolado em 0,8% de crianças africanas seronegativas para VIH, sem sintomatologia (Bretagne et al. 1993). Os autores do estudo sugeriram que a ocorrência do parasita estava relacionada com a existência de portadores do parasita sem sintomatologia entre os imunocompetentes residentes em regiões tropicais.

A ocorrência de *Cryptosporidium* spp. foi de 0,7% (3/433), resultado inferior a um estudo transversal feito com 393 crianças que frequentavam escolas primárias rurais no distrito de Bahir Dar, Etiópia (4,6%) (el Lucio et al., 2016). No Nepal, Sherchand e colaboradores (2016) encontraram uma prevalência de 29,4% do parasita em 187 crianças em idade escolar. Um estudo feito na Nigéria constatou que a taxa de prevalência de *Cryptosporidium* em crianças com diarreia foi 4,8% (8/165), esta prevalência foi semelhante aos resultados relatados anteriormente em estudos feitos em crianças de várias partes do mundo com prevalência de 4,0 a 4,4% (Kimura, 1980). A frequência relatada na China foi de 3,6% (Nevine et al., 2012), no Uganda foi de 5,9% (Tumwine, 2005), mas há uma variação acentuada em relação a outras frequências relatadas (15,6% - 19,6%) (Xiao et al, 2001). A baixa prevalência encontrada no nosso estudo pode ser devida à variação sazonal, a fraca pluviosidade nas Ilhas de Cabo Verde, e a fraca excreção do parasita nas fezes. A criptosporidiose humana pode ocorrer esporadicamente (Hunter et al., 2004, Roy et al., 2004), mas também é comumente associada a surtos ligados a creches infantis, alimentos

contaminados (Graczyk & Fried, 2007, Greig et al., 2007), piscinas e reservatórios de água potável contaminados (MacKenzie et al., 1994, 1995a, Fayer et al., 2000, Glaberman et al., 2002, Cohen et al., 2006, Karanis et al., 2007).

O estudo epidemiológico sobre parasitas intestinais tem por objetivo determinar as principais doenças e seus respectivos agentes etiológicos que se encontram distribuídos por todo o mundo, de forma endêmica ou epidêmica. As infecções causadas por helmintos e protozoários estão entre os mais frequentes problemas de saúde do mundo. No total verificou-se maior frequência de protozoários (66,7%) do que de helmintas (11,3%) na população estudada, diferença esta que foi significativa ($p=0,015$). A baixa frequência de helmintas explica-se pelo facto de as crianças serem desparasitadas de seis em seis meses. Após o estudo feito em Cabo Verde em 2005, no qual se detetou uma prevalência de parasitoses (helmintas) na ordem dos 50%, as autoridades de saúde pública do país recomendaram a desparasitação nos jardins infantis e escolas, duas vezes por ano. Estas ações tiveram início em 2007 a nível nacional. A medicação utilizada deve ser o Mebendazol 500mg (dose única) (Ministério de Saúde, 2005).

H. nana foi a espécie predominante entre os helmintas, no entanto, a prevalência geral foi relativamente baixa (10,9%). Nota-se que *H. nana* também foi a principal espécie de helmintas encontrada em estudos feitos na Burkina Faso (Karou et al., 2011, Ouermi et al., 2012), e nos países onde o saneamento do meio e a higiene pessoal são inadequados (CDC, 2016; Craig, 2007). Contudo, não encontramos uma prevalência estatisticamente significativa nas crianças visto que não houve ocorrência do parasita nos adultos.

Outros helmintas encontrados foram *A. lumbricoides* 0,5% e *E. vermicularis* 0,5%. A sua presença demonstra falha no sistema de saneamento básico da região e da higiene pessoal.

As infecções causadas por parasitas intestinais podem provocar febre, diarreia, dor abdominal, vômitos e dor de cabeça e podem resultar numa redução da ingestão alimentar, reduzindo assim a disponibilidade de nutrientes, contribuindo assim para a subnutrição. Das informações fornecidas pelos responsáveis das crianças, num período inferior a um ano, 90,5% das crianças apresentavam alguns dos sintomas acima referidos. As helmintíases e as protozooses são doenças de manifestação espectral,

variando desde casos assintomáticos, casos leves a casos graves (Melo et al., 2004). A sintomatologia das enteroparasitoses é bastante variável, os quadros graves ocorrem em doentes com maior carga parasitária, imunodeprimidos, desnutridos, doentes neoplásicos, portadores de doenças como anemia falciforme, tuberculose (Souza, 2002). Da totalidade dos indivíduos que participaram do estudo 90,5% apresentavam sintomas como, febre, diarreia, dor abdominal, vômito e dor de cabeça. Dos sintomas estudados o mais frequente foi a dor abdominal com 77,1% de ocorrência. Quanto às manifestações clínicas apresentadas não se encontraram associações estatisticamente significativas com os grupos de participantes em estudo.

A escolaridade dos pais ou encarregados de educação auxilia muito no entendimento do processo de educação e saúde das crianças, especialmente nas medidas preventivas quanto à ocorrência de enteroparasitoses. A educação é o fator determinante para minimizar os problemas de saúde pública graves relacionados com as enteroparasitoses, quanto maior a escolaridade maior é a compreensão da importância dos cuidados de higiene pessoal, dos cuidados no preparo dos alimentos e no controlo das infeções parasitárias (Santos, 2003; Macedo 2005). No entanto, neste estudo foi observada claramente esta constatação, visto que 58,9% dos responsáveis tinham frequentado a escola até ao ensino secundário e destes 40,9% estavam parasitados por algum parasita. O grau de escolaridade do responsável familiar ajuda no estímulo e na busca de conhecimentos profiláticos para combater as parasitoses intestinais. Esse aspeto também é importante, pois acredita-se que a educação é crucial para os entendimentos dos procedimentos de educação e saúde (Macedo, 2005). Outros estudos têm vindo a demonstrar a importância da escolaridade das cuidadoras ao nível da infeção por parasitas intestinais. No estudo realizado na Guiné-Bissau por Steenhard et al., (2009), no qual participaram 706 crianças dos 4 aos 12 anos de idade, foi encontrada uma associação entre a mãe ter frequentado a escola e uma menor prevalência de helmintas em conformidade com os resultados deste estudo. Na totalidade 4,6% dos responsáveis pelas crianças eram analfabetos, apesar de baixo é de extrema importância visto que demonstra que o grau de literacia é de extrema importância para prevenir a transmissão de parasitas porque neste estudo dos 4,6% dos responsáveis que são analfabetos 3,6% dessas crianças estavam parasitados. As altas frequências de parasitoses encontradas neste estudo podem estar relacionadas não só

com a escolaridade, mas também com os hábitos culturais. Segundo Dias (1998) a erradicação desses parasitas requer melhorias das condições socioeconômicas, no saneamento básico e na educação sanitária, além de mudanças de certos hábitos culturais.

4.3. Fatores Sociodemográficos e Ambientais

A água tem influência direta sobre a saúde, a qualidade de vida e o desenvolvimento do ser humano. Para a WHO, todas as pessoas, em qualquer fase de desenvolvimento e de diferente situação socioeconômica, têm o direito de ter acesso a um suprimento adequado e seguro de água potável, sendo uma necessidade absoluta para a vida. A água deve ter uma qualidade apropriada, livre de quaisquer organismos que possam causar doenças. Essas doenças são causadas principalmente por microrganismos patogênicos de origem entérica, animal ou humana, transmitidos pela via fecal-oral, ou seja, são excretados nas fezes dos indivíduos infetados e ingeridos através de água ou alimento contaminado (Amaral et al., 2003).

A água utilizada para beber neste estudo não foi um dado informativo visto que as casas de 99,5% dos participantes utilizavam água canalizada para beber e, destes, mais de metade (69,5%) apresentavam algum tipo de infecção parasitária. Este valor demonstra que durante o percurso que a água faz até ser consumida, ela foi contaminada por fezes de humanos ou de animais infetados por parasitas intestinais, reforçando o que já foi mencionado anteriormente, que o saneamento do meio é precário. A qualidade da água usada para consumo é um componente importante para ajudar na compreensão das possíveis fontes de contaminação por parasitas. O controlo dessa qualidade é fundamental para a diminuição da incidência de enteroparasitoses na população em geral, visto que a água contaminada ou sem tratamento é o meio mais rápido e eficiente de disseminação de diversas doenças parasitárias, bacterianas e víricas a um grupo significativo da população.

A caracterização dos participantes deste estudo de acordo com o destino dos dejetos humanos dividiu-se em três categorias: destino do esgoto a céu aberto, utilização de fossa para a eliminação de águas residuais e existência de rede de esgoto. Em 28,0% das casas havia rede de esgoto, 40,5% tinham uma fossa séptica em casa e 31,6% das casas não tinham nenhum tipo de ligação para as águas residuais. O facto

de ter ou não um destino seguro para o esgoto teve muita influência na ocorrência dos parasitas, uma vez que a maior percentagem dos parasitas foi observada nos participantes cujas casas não tinha nenhuma ligação para as águas residuais.

A rede de esgoto no município de Santa Cruz abrange um número reduzido de domicílios, desta forma o destino das águas residuais depende situação económica e da cultura dos moradores. Em áreas onde a rede de esgoto é inexistente a descarga das águas residuais é feita através de fossas sépticas, construídas pelo próprio proprietário da casa e a maioria delas permitem a infiltração das águas residuais no subsolo e a contaminação dos cursos de água subterrâneos. Este facto é de extrema importância, pois os dejetos humanos que vão para o ambiente sem nenhum tratamento possibilitam a proliferação e transmissão de muitas doenças para homem.

A falta de saneamento ambiental é um dos principais fatores relacionados com as doenças humanas no mundo, principalmente as de veiculação hídrica. No município de Santa Cruz existe uma estação de tratamento de águas residuais mas ela não abrange a maior parte da população. Assim, a maioria da população possui casas ligadas a fossa séptica ou então os dejetos vão diretamente para o ambiente, a céu aberto, o que causa forte impacto nos solos e nas águas superficiais devido à exposição das águas residuais nestes ambientes.

Relacionando os dados da ligação das águas residuais com os hábitos de defecação, é possível afirmar que nem sempre os participantes que apresentavam instalações sanitárias, defecavam nas mesmas, pois esses resultados não coincidem com o hábito da defecação relatados, visto que 59,1% dos participantes neste estudo afirmaram defecar ao ar livre. Isto poderá explicar a alta frequência de parasitas encontrada nas amostras de fezes estudadas, em relação ao ato de defecar ao ar livre (70,3%). A defecação feita ao ar livre possibilita a transmissão fecal-oral, devido ao menor grau de cuidados que se verifica e a maior predisposição ao contacto com matérias fecais de outras pessoas e animais, por contacto com o solo. Também nesta área do saneamento básico não se verificou nenhuma associação significativa entre nenhum destes fatores e a frequência de parasitados. Esta frequência foi semelhante nas diferentes situações de saneamento básico. Isto pode ser explicado pelo facto de a maioria da população ter condições de falta de saneamento semelhantes.

No que diz respeito à convivência com animais domésticos, 89,1% dos participantes apresentavam pelo menos um animal em casa e destes 70,2% estavam parasitados. A presença de animais no domicílio pode estar relacionada com a prevalência de enteroparasitas, tendo em vista o potencial zoonótico de algumas espécies de parasitas como *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. ou *E. bienersi*. No entanto, neste estudo não se verificou nenhuma associação significativa entre a frequência de enteroparasitas e a convivência com animais. Os animais domésticos ocupam uma posição importante na sociedade humana, sendo inestimáveis os benefícios dessa convivência para a melhoria das condições fisiológicas, sociais e emocionais principalmente de crianças e idosos (Asano et al., 2004). A manifestação de todos os benefícios dessa convivência pode ser perdida se a saúde desses animais não for objeto dos maiores cuidados. A associação com o homem facilitou a dispersão dos animais domésticos por todos os continentes, da mesma forma que os próprios são hospedeiros, da maioria dos parasitas intestinais que apresentam distribuição cosmopolita e muitos deles com potencial zoonótico (Mccarthe & Moore, 2000).

No presente estudo o ato de lavar as mãos, também, não foi informativo porque as crianças relatavam que lavam as mãos às vezes, e essa resposta, não é fidedigna e pode induzir a falsos resultados, uma vez que a higienização é um dado importante para a compreensão da forma como os participantes se infetavam. Segundo Guinan et al. (1997) e Delabrida (2010) as pessoas que não lavam as mãos após o uso da casa de banho ou que lavam mas de forma muito rápida, pode estar relacionada com a alta frequência do protozoário *E. coli*. Outro fator que contribui para esta alta frequência deste protozoário comensal é a falta de materiais sanitários, como papel higiênico e sabão, nas casas de banho o que não ocorre nas escolas (Suriptiastuti and Manan, 2011; Moses et al., 2013)

4.4. Caracterização do estado nutricional

O crescimento é um importante indicador do bem-estar de uma criança ou adolescente. Os fatores neles implicados são múltiplos e vão desde a influência genética, fatores ambientais (nomeadamente a alimentação), fatores de ordem psicológica e um grande conjunto de doenças. Um atraso no desenvolvimento pode

ser a primeira manifestação de patologias como doença celíaca, doença intestinal inflamatória, infecção urinária, fibrose quística, infecção por VIH, entre outras.

Mundialmente a deficiência de ferro é considerada a causa mais comum de anemia, embora outras condições, como deficiências de folato, vitamina B12 e vitamina A, inflamação crónica, infeções parasitárias e distúrbios hereditários podem causar anemia (WHO, 2011)

A dosagem da hemoglobina feita neste estudo revelou que 22,4% das crianças em estudo apresentavam anemia. Este valor está abaixo dos 29,7% de anemia encontrada num rastreio efetuado na Angola entre 1998 e 1999 em 825 crianças com menos de 5 anos de idade (WHO/CDC, 2008). Essa diferença nas percentagens poderá estar relacionada com a diferença de grupos etários abrangidos nestes estudos, sabendo-se que a anemia é mais prevalente em crianças em idade pré-escolar (Fleming et al, 2009). As crianças são especialmente vulneráveis à anemia por deficiência de ferro devido a maior necessidade de ferro que apresentam durante o crescimento, principalmente nos primeiros cinco anos de vida. Estima-se que 600 milhões de crianças em idade escolar em todo o mundo sejam anémicas e que pelo menos metade desses casos seja atribuída a deficiência de ferro (WHO/CDC, 2008). Esta anemia nas crianças está ligada ao aumento da morbilidade infantil e ao desenvolvimento cognitivo e escolar inadequado. Os dados epidemiológicos e experimentais sugerem que, se tais danos ocorrerem numa idade tenra, poderão ser irreversíveis, mesmo após a reposição das reservas de ferro, o que reforça a importância de prevenção dessa condição (Beard, 2001; Lozoff, 2007).

As enteroparasitoses podem afetar o equilíbrio nutricional, pois interferem na absorção de nutrientes, induzem hemorragia intestinal, reduzem a ingestão alimentar e ainda podem causar complicações significativas, como obstrução intestinal, prolapso retal e formação de abscessos, em caso de superpopulação parasitária, podendo levar o indivíduo à morte (Costa et al, 1999). O presente estudo encontrou uma frequência de 22,4% das crianças com parasitas que tinham anemia por deficiência de ferro, 22,6% das crianças com baixo peso estavam anémicos e 22,7% das crianças que tinham a altura para a idade baixa com anemia. Não se observou associações estatisticamente significativas entre a presença de anemia e de parasitas e a altura e/ou o peso baixos para a idade, contrariamente ao estudos feitos por Santos e colaboradores

em 2005, que encontraram 78,8% de alunos infetados por parasitas intestinais, como *A. lumbricoides*, família Ancylostomidae e *S. mansoni*, sendo que 29% destes indivíduos estavam com anemia por deficiência de ferro e 34% com desnutrição. No entanto, os autores não observaram associação estatisticamente significativa entre parasitoses ou desnutrição e a anemia por deficiência de ferro.

Dentre os protozoários que podem estar relacionados com a anemia verificou-se que 22,2% das crianças infetadas por *G. duodenalis* tinham anemia. Em estudos feitos na Turquia com crianças (seis a 59 meses), os autores verificaram que a infecção por *G. duodenalis* prejudicou o crescimento de crianças, levando a um quadro de desnutrição aguda e crónica, quando comparado com crianças com outras infecções parasitárias (Simsek et al., 2004). Este protozoário também contribuiu significativamente para a redução do peso para a idade e altura para a idade entre crianças residentes em uma favela de Brasília (Muniz & Queiróz, 2002).

As crianças infetadas por *H. nana* apresentam maior probabilidade de ter anemia quando comparadas com as crianças sem infecção por *H. nana*. No entanto, não encontramos estudos onde tenha sido observada associação significativa entre a anemia e a infecção por *H. nana*. Desconhece-se ao certo se este parasita tem poder patogénico ou se funciona como um indicador de infecção fecal-oral, falta de saneamento e pobreza (Baily, 2009).

A ocorrência de monoparasitismo e poliparasitismo em estudos epidemiológicos é comum por causa da disseminação dos enteroparasitas e pela facilidade com que são transmitidos através da água e alimentos contaminados (Armengol et al., 1999). No presente estudo a ocorrência de anemia em crianças com poliparasitismo foi baixa (3,4%) em relação às crianças com monoparasitismo (4,8%), demonstrando que a ocorrência de anemia não foi devida à existência de vários parasitas intestinais no mesmo indivíduo.

Neste estudo podemos concluir que em Cabo Verde vários parasitas patogénicos contribuem para a doença gastrointestinal em crianças em idade escolar, sendo *Giardia duodenalis* o principal parasita entérico patogénico. Uma vez que as crianças constituem quase metade da população total deste país, estratégias de intervenção adequadas para o controlo das enteroparasitoses, como a melhoria da

higiene doméstica e pessoal, a melhoria da alimentação infantil e práticas de controlo zoonótico e controlo dos reservatórios de água precisam de ser implementadas.

CAPÍTULO V:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abath F. G, Morais C. N., Montenegro C. E., Wynn T.A., Montenegro S. M. 2006. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies. *Trends Parasitol.* 22: 85-91.

Adam, R.D. 2001, 'Biology of Giardia lamblia'. *Clin. Microbiol*, 14, 447- 475.

Abossie, A., & Seid, M., 2014. Assessment of the prevalence of intestinal parasitosis and associated risk factors among primary school children in Chench town, Southern Ethiopia. *BMC Public Health*, 14, 1-8.

Abreu-Acosta, N., Quispe, M. A., Foronda-Rodríguez, P., Alcoba-Florez, J., Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., & Valladares, B., 2007. *Cryptosporidium* in patients with diarrhoea, on Tenerife, Canary Islands, Spain. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 101,539-545.

Adjei, A.A., Armah, H., Rodrigues, O., Renner, L., Borketey, P., Ayeh kumi, P., Adiku, T., Sifah, E., Lartey, M. 2004. *Cryptosporidium* spp., a frequent cause of diarrhea among children at the Korle-Bu Teaching Hospital, Accra, Ghana. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 57, 216-219.

Aguila, C. D., Navajas, R., Gurbindo, D., Ramos, J. T., Mellado, M. J., Fenoy, S., Munoz Fernandez, M. A., Subirats, M., Ruiz, J. & Pieniazek, N. J., 1997. Microsporidiosis in HIV-Positive Children in Madrid (Spain). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44: 84S-85S.

Akinbo F. O, Okaka CE, Omoregie R, Dearen T, Leon ET, Xiao L. 2012. Molecular epidemiologic characterization of *Enterocytozoon bienersi* in HIV-infected persons in Benin City, Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86:441–445.

Al-Hindi, A. I., Elmanama, A. A., & Elnabris, K. J. A., 2007. Cryptosporidiosis among children attending Al-Nasser pediatric hospital, Gaza, Palestine. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 37: 367-372.

- Ali I., Clark C. and Petri W. 2008. Molecular epidemiology of Amebiasis; *Infection, Genetics and Evolution* 8, 698–707.
- Albrecht, H., Stellbrink, H.J., Koperski, K. & Greten, H. (1995). Human Immunodeficiency Virus –Related Diarrhea. *Scand J. Gastroenterol.* 30, 909 –914.
- Albuquerque, L. 2002. História Geral de Cabo Verde: in FERNANDES, Gabriel. A diluição da África, Lisboa.
- Alpert, G., Bell, L.M., Kirkpatrick, C.E. 1986. Outbreak of cryptosporidiosis in a day-care center. *Pediatrics, Evanston.* 7,152-157.
- Amaral, L. A. D., Nader Filho, A., Rossi Junior, O. D., Ferreira, F. L. A., & Barros, L. S. S., 2003. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. *Revista de Saúde Pública*, 37:510-514.
- Amato Neto V, Corrêa L.L. 1991.Exame parasitológico das fezes. *Sarvier*, São Paulo.
- Amendoeira, M.R.R., Martinez, E. M., Freitas, G. T. P., Correia, J.A.S., Pereira, L.C.F., Rangel, M.L., Camilla-coura L. 2002. Estudo das enteroparasitoses em escolares da Rede Pública de Cascadura – Rio de Janeiro. *Revista Souza Marques*, 1.
- Andiran, N., Acikgoz, Z. C., Turkay, S., & Andiran, F., 2006. *Blastocystis hominis* an emerging and imitating cause of acute abdomen in children. *Journal of pediatric surgery*, 41:1489-1491.
- Armengol, C. P., *et al.*, 1999. Epidemiologia del parasitismo intestinal infantil em el Valle Del Guadalquivir – España. *Revista Española Salud Pública*, 71, 547-552.
- Asano, K., Suzuki, K., Matsumoto, T., Sakai, T., & Asano, R., 2004. Prevalence of dogs with intestinal parasites in Tochigi, Japan in 1979, 1991 and 2002. *Veterinary parasitology*, 120: 243-248.
- Ayalew, D., Boelee, E., Endeshaw, T., & Petros, B., 2008. *Cryptosporidium* and *Giardia* infection and drinking water sources among children in Lege Dini, Ethiopia. *Tropical Medicine & International Health*, 13: 472-475.

Beard J.L. 2001. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *Journal of Nutrition*. 131, S568–S579.

Balci, Y. I., Türk, M., Polat, Y., & Erbil, N., 2008. The distribution of intestinal parasites among children in Denizli. *Turkiye parazitoloji dergisi/Turkiye Parazitoloji Dernegi. Acta parasitologica Turcica/Turkish Society for Parasitology*, 33: 298-300.

Beard, J. L., 2001. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *The Journal of nutrition*, 131: 568S-580S. Bienz, Kurt A., Eckert, Johannes, Kayser, Fritz H., Zinkernagel, Ralf M., 2004. *Medical Microbiology*, 3^a edition, Zurich, 476-602.

Blessmann, J., Van, L. P., Nu, P. A. T., Thi, H.D. Myhsok, B.M., Buss, H., Tannich, E. 2002. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in Central Vietnam. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 66, 578-583.

Bretagne, S., Foulet, F., Alkassoum, W., Fleury-Feith, J., & Develoux, M. 1992. Prevalence of *Enterocytozoon bienersi* spores in the stool of AIDS patients and African children not infected by HIV. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique*, 86: 351-357.

Bronsdon, M.A. 1984. Rapid dimethyl sulfoxide-modified acid-fast stain of *Cryptosporidium* oocysts in stools specimens. *The Journal of Clinical Microbiology*, Washington DC. 19, 952-953.

Brooker S, Bundy DAP. 2009. Soil-transmitted helminths (geohelminths). Manson's Tropical Medicine, 22nd Edneds Cook G C, Zumla A, editors. pp.1526–1530.1530 London: Elsevier Health Sciences

Brooker, S., Clements, A.C.A., Bundy, D.A. 2006, 'Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections'. *Adv Parasitol*. 62, 221- 261.

Cacciò S.M., Beck R., Lalle M., Marinculic A., Pozio E. 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Intern J Parasitol*. 38, 1523-1531.

Cacciò S.M., De Giacomo M., Pozio E. Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int. J. Parasitol.* 2002;32:1023–1030.

Cacciò, S. M., & Ryan, U., 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and biochemical parasitology*, 160:75-80.

Cacciò, S.M., Thompson, R.C., Mclauchlin, J. & Smith, H.V. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol*, 21, 430-7.

Carrascosa, M., Martinez, J., & Perez-Castrillon, J. L., 1996. Hemorrhagic proctosigmoiditis and *Blastocystis hominis* infection. *Annals of internal medicine*, 124:278-279.

Casemore, D. Armstrong, M., Sands, R. 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*. 38, 1337-1341.

CDC, 2017. Parasites - Blastocystis spp. Infection. <http://www.cdc.gov/crypto/>

CDC. 2016. Parasites - hymenolepiasis.. <http://www.cdc.gov/parasites/>

Cegielski, J. P., Ortega, Y. R., McKee, S., Madden, J. F., Gaido, L., Schwartz, D. A., Manji, K., Jorgensen, A. F., Miller, S. E., Pulipaka, U. P., Msengi, A. E., Mwakyusa, D. H., Sterling, C. R. & Reller, L. B., 1999. *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, and *Cyclospora* infections in pediatric and adult patients with diarrhea in Tanzania. *Clinical Infectious Diseases*, 28:314-321.

Chacín, B.L., Sánchez, C.Y. 2000. Intestinal parasitic infections, with a special emphasis on cryptosporidiosis, in Amerindians from western Venezuela. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Cleveland*. 62, 347-352.

Chalmers, R.M., Davies, A.P. 2010. Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Exp Parasitol*, 124, 138-46.

- Chen, X.M., Keithly, J.S., Paya, C.V., Larusso, N.F. 2002. Cryptosporidiosis. *The New England Journal of Medicine*. 346, 1723-1732.
- Chieffi, P.P., Amato N.V. 2003. Vermes, Verminoses e a Saúde Pública. *Ciência e Cultura*, 55,163-170.
- Chiodini, G., F. Frondini, C. Cardellini, D. Granieri, L. Marini, and G. Ventura 2001a, CO² degassing and energy release at Solfatara volcano, Campi Flegrei, Italy, *J. Geophys. Res.*, 106(B8), 16,213–16,221.
- Chiodini, P.L., Manser, D.W., Moody, A.H., 2001b. Atlas of medical Helminthology and Protozoology, *Churchill livingstone*, United Kingdon.
- Cohen S, Dalle F, Gallay A, Di Palma M, Bonnin A, Ward HD. 2006. Identification of Cpgp40/15Type Ib as the predominant allele in isolates of *Cryptosporidium* spp. from a waterborne outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. *J Clin Microbiol*. 44:589–91
- Current, W.L., Garcia, L.S. 1991. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*, 4, 325-358.
- Cook G. and Zumla A. 2009. Manson's Tropical Diseases. Saunders Elsevier, Twenty-second Edition.
- Cooper P., Alexander N., Moncayo A., et al. 2008. Environmental determinants of total IgE among school children living in the rural Tropics: importance of geohelminth infections and effect of anthelmintic treatment; *BMC Immunology*. 9, 33.
- Costa-Macedo L, Costa M.C.E., Almeida L.M. 1999. *Ascaris lumbricoides* in infants: a population-based study in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica*. 15, 173-178.
- Craig P, Ito A. 2007. Intestinal cestodes. *Curr Opin Infect Dis*. 20:524–32.
- DeCarli, G.A. 2001. Parasitologia clínica – seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitas humanas. Atheneu. São Paulo.
- Delabrida Z. N. 2010. O cuidado consigo e o cuidado com o ambiente físico: estudo sobre o uso do banheiro público. Brasília: Universidade de Brasília,;

del Lucio, A., Amor-Aramendía, A., Bailo, B., Saugar, J. M., Anegagrie, M., Arroyo, A., López-Quintana, B., Zewdie, D., Ayehubizu, Z., Yizengaw, E., Abera, B., Yimer, M., Mulu, W., Hailu, T., Herrador, Z., Fuentes, I., Carmena, D., 2016. Prevalence and Genetic Diversity of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. among School Children in a Rural Area of the Amhara Region, North-West Ethiopia. *PloS one*, 11: e0159992.

Dent, A.E., Kazura, J.W., 2011. 'Ascariasis (*Ascaris lumbricoides*)' in Kliegman, R.M. Stanton, B.M.D., Geme, JS; Nina, S; Behrman, R.E. 2011, Nelson Textbook of Pediatrics. 19th ed., Elsevier Saunders, Philadelphia, 1217-1218.

Desportes, I., Le, C. Y., Galian, A., Bernard, E., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P. Modigliani, R. 1985. Ocurrance of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J.Protozool.*, 32, 250-254.

Dias, G. F., 1998. Educação ambiental. Princípios e práticas. Ed. Global, 5ª edição. São Paulo.

Didier, E.S. 2005. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop.* 94, 61-76.

Didier, E. S., Maddry, J. A., Brindley, P. J., Stovall, M. E. & Didier, P. J. (2005). Therapeutic strategies for human microsporidia infections. *Expert.Rev.Anti.Infect.Ther.* 3, 419-434.

Didier, E.S., Snowden, K. F., Shadduck, J.A. 1998. Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv.Parasitol.* 40, 283-320.

Dillingham, R.A., Lima, A.A. Guerrant, R.L. 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes Infect.* 4, 1059-66.

Dogruman-Al, F., Simsek, Z., Boorum, K., Ekici, E., Sahin, M., Tuncer, C., ... & Altinbas, A., 2010. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PloS one*, 5:e15484.

- Eckmann L., Gillin F. 2001. Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*. 280, G1–G6.
- Ekdahl K., Andersson Y. 2005. Imported giardiasis: Impact of international travel, immigration, and adoption. *Am J Trop Med Hyg*. 72, 825-30.
- Eleonor, T., Vincente, Y., Winifreda, U., Hyun, H., Dong, C., 2004. Infection status of intestinal parasites in children living in residential institutions in MetroManila. The Philippines. *The Korean Journal of Parasitology*, 42:67–70
- Erismann, S., Knoblauch, A. M., Diagbouga, S., Odermatt, P., Gerold, J., Shrestha, A., Tarnagda, G., Savadogo, B., Schindler, C., Utzinger, J., & Cissé, G., 2017. Prevalence and risk factors of undernutrition among schoolchildren in the Plateau Central and Centre-Ouest regions of Burkina Faso. *Infectious Diseases of Poverty*, 6:17.
- Esteban, J.G., Aguirre, C., Flores, A., Strauss, W., Angles Coma, S. 1998. High *Cryptosporidium* prevalences in healthy Aymara children from the northern bolivian altiplano. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Cleveland*. 58, 50-55,
- Evangelopoulos, A., Legakis, N., Vakalis N. 2001. Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece. *Parasitology International*, 50, 185-189.
- Farthing, M.J., Cevallos, A; Kelly, P 2009, 'Intestinal Protozoa' in Cook, G.C. Zumla, A.I. Manson's Tropical Diseases. 22^a ed. Elsevier Saunders.
- Fauci. B., Isselbacher, W., Martin, K., Hauser, L. 1998. Harrison: Medicina Interna 14^a ed. McGraw Hill: Rio de Janeiro.
- Fayer R. 2010. Taxonomy and species delimitation in the genus *Cryptosporidium*. *Exp Parasitol*. 124, 90–7.

- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J. 2000 Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30, 1305-1322.
- Fernandes, S., Beorlegui, M., Brito, M.J., Rocha, G. 2011. Protocolo de Parasitoses Intestinais, Sociedade de Infecçiology Pediátrica.
- Ferreira, C.B.; Marçal, J. 1997. Intestinal Parasitoses in school children of Martinésia District; Uberlândia, MG, a pilot study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 30, 373-377.
- Fleming, Alan F., Silva, P., Shanthamali. 2009. Haematological Diseases in the Tropics. In Cook, G.C., Zumla, A.I. (2008). *Manson's Tropical Diseases*.
- Foronda, P., Bargues, M. D., Abreu-Acosta, N., Periago, M. V., Valero, M. A., Valladares, B., & Mas-Coma, S., 2008. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitology research*, 103: 1177-1181.
- Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J. 2007. PCR detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* in stool samples from Sydney, Australia. *J Clin Microbiol*. 45:1035–7
- Fox, L.M., Saravolatz, L.D. 2005. Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clin Infect Dis*. 40, 1173-80.,
- Foxman, B., & Riley, L. 2001. Molecular epidemiology: Focus on infection. *American Journal of Epidemiology*, 153, 1135-1141.
- Gainzarain, J. C., Canut, A., Lozano, M., Labora, A., Carreras, F., Fenoy, S., Navajas, R., Pieniazek, N. J., da Silva, A. J. & del, A. C. 1998. Detection of *Enterocytozoon bieneusi* in two human immunodeficiency virus-negative patients with chronic diarrhea by polymerase chain reaction in duodenal biopsy specimens and review. *Clin.Infect.Dis.*, 27, 394-398.
- Garcia, L.S., Shimizu, R.Y. 1993. Diagnostic parasitology: An overview of topics. *Lab Med*. 24,13- 18.

- Gatei, W., Wamae, C. N., Mbae, C., Waruru, A., Mulinge, E., Waithera, T., Gatika, S. M., Kamwathi, S. K., Revathi, G. & Hart, C. A., 2006. Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75:78-82.
- Gilles, H.M. 2003. 'Soil-transmitted Helminths (Geohelminths)' in Cook, G.C. Zumla, A.I. Manson's Tropical Diseases. 22^a ed. *Elsevier Saunders*.
- Gelanew, T., Lalle, M., Hailu, A., Pozio, E., & Cacciò, S. M., 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta tropica*, 102:92-99.
- Gelaw, A., Anagaw, B., Nigussie, B., Silesh, B., Yirga, A., Alem, M., Endris, M. & Gelaw, B., 2013. Prevalence of intestinal parasitic infections and risk factors among schoolchildren at the University of Gondar Community School, Northwest Ethiopia: a cross-sectional study. *BMC public health*, 13:304.
- Glaberman S, Moore J. E, Lowery C. J, Chalmers RM, Sulaiman I, Elwin K, Rooney PJ, Millar B. C, Dooley JS, Lal AA, Xiao L. 2002. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg Infect Dis*. 8:631–3.
- Gomez, M. A., Atzori, C., Ludovisi, A., Rossi, P., Pozio, E. 1995. Opportunistic and non-opportunistic parasites in HIV-positive and negative patients with diarrhoea in Tanzania. *Trop.Med.Parasitol*. 46, 109-114.
- Graczyk T. K, Fried B. 2007. Human waterborne trematode and protozoan infections. *AdvParasitol*. 64:111–60.
- Graczyk, T. K., Shiff, C. K., Tamang, L., Munsaka, F., Beitin, A. M., & Moss, W. J., 2005. The association of *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* with diarrheal stools in Zambian school-age children. *Parasitology research*, 98:38-43.
- Greig JD, Todd EC, Bartleson CA, Michaels BS. 2007. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 1. Description of the problem, methods, and agents involved. *J Food Prot*. 70:1752–61.

- Grisard, E.C. Steindel M., Shaw, J.J. 1999. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. *Acta Tropica*. 74, 89-93.
- Gryschek, R.C.B., Lescano, S.A.Z. 'Ascaridíase' in Neto, V.A., Amato, V.S., Tuon, F.F. 2008. Parasitologia uma abordagem clínica, *Elsevier Editora Lda.*, 239-243
- Gumbo, T., Sarbah, S., Gangaidzo, I. T., Ortega, Y., Sterling, C. R., Carville, A., Carville, A., Tzipori, S. & Wiest, P. M., 1999. Intestinal parasites in patients with diarrhea and human immunodeficiency virus infection in Zimbabwe. *Aids*, 13:819-821.
- Guinan ME, McGuckin-Guinan M, Severeid A. 1997. Who washes hands after using the bathroom. *Am J Infect Control*. 25:424–425.
- Hanelt, A. C. M, Mansour M. H. & Loker E. S, 1997. Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. *The Journal of Parasitology*, 83:387-394.
- Haque, R., Ali, I. K. M., Sack, B., Farr, B.M., Ramakrishnan, G., Petri, W.A. Jr. 2001. Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *Journal of Infectious Diseases*, 183: 1787-1793.
- Haque, R, Mollah, N.U., Ali, I.K., Alam, K., Eubanks, A., Lysterly, D., Petri, W.A. 2000. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TecLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol*. 38, 3235-3239.
- Hawrelak, J. 2003. Giardiasis: Pathophysiology and Management. *Alternative Medical* Ver. 8, 129-142.
- Homan WL, Mank TG. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol*. 2001; 31:822–6.
- Hooshyar, H., Rezaian, M., Kazemi, B., Jeddi-Tehrani, M., Solaymani-Mohammadi, S. (2004). The distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern, central, and southern Iran. *Parasitology Research*, 94: 96-100.

Hunter, P.R., Nichols, G. 2002. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*, 15, 145-54.

Hunter, P. R., Hughes, S., Woodhouse, S., Syed, Q., Verlander, N. Q., Chalmers, R. M., Morgan, K., Nichols, G., Beeching, N. & Osborn, K., 2004. Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. *Emerging infectious diseases*, 10: 1241-1249.

INE. 2010. Recenseamento Geral da População e Habitação. Praia, Cabo Verde.

Jernigan, J., Guerrant, R.L., Pearson, R.D. 1994. Parasitic infections of the small intestine. *Gut*. 35, 289-293.

Jex, A.R., Smith, H.V., Monis, P.T. Campbell, B.E. & Gasser, R.B. 2008 *Cryptosporidium*-Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances*, 26, 304-317.

John, C.C. 2011, 'Giardiasis and Balantidiasis' in Kliegman, R.M., Stanton, B.M.D, Geme, J.S., Nina, S., Behrman, R.E. 2011, Nelson Textbook of Pediatrics, 19th ed., Elsevier Saunders, Philadelphia.

Karanis, P., Kourenti, C., & Smith, H., 2007. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of water and health*, 5:1-38.

Karou S, Sanou D, Ouermi D, Pignatelli S, Pietra V, Moret R, et al. 2011. Enteric parasites prevalence at Saint Camille Medical Centre in Ouagadougou, Burkina Faso. *Asian Pac J Trop Med*. 4:401–3.

Khairnar K, Parija S. C, Palaniappan R. Diagnosis of intestinal amoebiasis by using nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *J Gastroenterol*. 2007;42:631–40

Kosek, M., Alcantara, C., Lima, A.A., Guerrant, R.L. 2001. Cryptosporidiosis: an update. *Lancet Infect Dis*. 1, 262-9.

- Lalle M., Pozio E., Capelli G., Bruschi F., Crotti D., Cacciò S.M. 2005. Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int. J. Parasitol.* 35:207–213.
- Laubach, H.E., Bentley, C.Z., Ginter, E.L., Spalter, J. S., Jensen, L. A.A. 2004. study of risk factors associated with the prevalence of *Cryptosporidium* in villages around Lake Atitlan, Guatemala. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8, 319-323.
- Leelayoova, S., Rangsin, R., Taamasri, P., Naaglor, T., Thathaisong, U., & Mungthin, M., 2004. Evidence of waterborne transmission of *Blastocystis hominis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70:658-662.
- Leelayoova, S., Subrungruang, I., Rangsin, R., Chavalitsheewinkoon-Petmitr, P., Worapong, J., Naaglor, T., Mungthin, M. 2005. Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* genotype a in a Thai orphanage. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 73, 104-107.
- Leiva, B., Lebbad, M., Winiecka-Krusnell, J., Altamirano, I., Tellez, A., Lindera, E. 2006. Overdiagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: a microscopic, triage parasite panel and PCR study. *Archives of Medical Research*, 37, 529-534.
- Lerner, N.B. 2011. The Anemias. In Kliegman, Robert M. Nelson Textbook of Pediatrics. 19^a ed. *Philadelphia: Elsevier Saunders*.
- Llop, A. H. Valdés, D., Vivanco, M.M., Zuazo, J.LS. 2001. Microbiología y Parasitología Médicas; Tomo III; Ciudad de La Habana.
- Liguory, O., Sarfati, C., Derouin, F., Molina, J.M. 2001. Evidence of different *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J.Clin. Microbiol.* 39, 2672-2674.
- Lindo, J. Gatei, W. Barret, D. Eldemire-Shearer, D. Cama, V. & Xiao, L. 2008 Unique *Cryptosporidium* population in HIV-infected persons, Jamaica. *Emerging Infectious Disease*, 14, 841-843.

Long QX, Sen HY, Ze XJ, Jia LY, Chang QL, Xiang JZ. 1995. Soil transmitted helminthiasis: nationwide survey in China. *Bull W Health Organ.* 73:507–513.

Lobo M.L, 2010. “Epidemiologia e Caracterização de Espécies Implicadas na Microsporidiose Humana em Portugal por Análise Parasitológica e Molecular”. Tese de dissertação para obtenção do grau de Doutor no Ramo Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
http://catalogo.bnportugal.pt/ipac20/ipac.jsp?session=U358779VX9546.164555&profile=bn&uri=link=3100018~!1474227~!3100024~!3100022&aspect=basic_search&menu=search&ri=2&source=~!bnp&term=Costa%2C+Maria+Lu%C3%ADsa+Lobo+Ferreira+da&index=AUTHOR#focus

Lobo, M. L., Augusto, J., Antunes, F., Ceita, J., Xiao, L., Codices, V., & Matos, O., 2014. *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bieneusi* and other intestinal parasites in young children in Lobata province, Democratic Republic of São Tomé and Príncipe. *PloS one*, 9: e97708.

Long, S.S., Pickering, L.K., Prober, C.G. 2008. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 3rd ed. Philadelphia. Churchill Livingstone.

Lopez-Velez R., Turrientes, M. C., Garron, C., Montilla, P., Navajas, R., Fenoy, S. Del, A. C. 1999. Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. *J.Travel.Med.* 6, 223-227

Lores, B., del, A. C.,Arias, C. 2002. *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) in faecal samples from domestic animals from Galicia, Spain. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, 97, 941-945.

Lozoff, B., 2007. Iron deficiency and child development. *Food and nutrition bulletin*, 28: S560-S571.

Ludwig, M. K., Frei, F. Alvares, F.A., Ribeiro, P. J. 1999. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses na população de Assis, estado de São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32, 547-555.

Macedo, H. S., 2005. Prevalência de parasitos e comensais intestinais em crianças de escolas da rede pública municipal de Paracatu (MG). *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 37: 209-213.

Machado, R. C. et al 1999. Giardíase e helmintíase em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32, 697-704.

McCarthy, J., & Moore, T. A., 2000. Emerging helminth zoonoses. *International journal for parasitology*, 30: 1351-1359.

MacKenzie WR, Kazmierczak JJ, Davis JP. 1995. An outbreak of cryptosporidiosis associated with a resort swimming pool. *Epidemiol Infect.*;115:545–53.

Mandomando I., Macete E., Ruiz J. 2007. Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. *American Journal of Tropical Medical Hygiene.* 76. 522-52.

Mamus, C., Moitinho, C.C., Grube, C.C., Melo, E.M., Weiler, C.A., Abreu, C., Beltrão, L., Soares, P.B., Beltrame, S., Ribeiro, S., Aleixo, D.L. 2008. ‘Enteroparasitoses em um Centro de Educação Infantil do Município de Iretama/PR’. *SaBios Rev Saúde e Biologia.* 3, 39-44.

Martinez, P.A. 1988. Biology of amoebiasis: progress and perspectives. *Biol Parasitism.* 43, 61-73.

Mascarini, S.L., Telles, C., Prado, M. 2010. Reductions in the Prevalence and Incidence of Geohelminth Infections following a City-wide Sanitation Program in a Brazilian Urban Centre. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 4, 588.

Mathis, A., Weber, R., Deplazes, P. 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 423-445.

Matos, O. & Lobo, M.L. 2015. *Enterocytozoon*. In: Molecular Biology of Food and Water borne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi. R. Russel M. Paterson & Nelson

Lima (editores). Food Microbiology Series (series editor: Dongyou Liu), CRC Press, Cap. 20, pp. 293-321.

Matos O, Lobo ML, Xiao L. 2012. Epidemiology of *Enterocytozoon bienersi* infection in humans. *J. Parasitol.* 2:981424.

Mehraj, V., Hatcher, J., Akhtar, S., Rafique, G., Beg, M.A. 2008. Prevalence and Factors Associated with Intestinal Parasitic Infection among Children in an Urban Slum of Karachi. *PLoS ONE*. 3.

Melo, M.C.B., Klem, V.G.Q., Mota, J.A.C., Penna, J.F. 2004. Parasitoses Intestinais. *Rev. Méd. Minas Gerais*. 14, 3-12.

Mercado, R., Arias, B., 1995. Infecciones por Taenia SP y otros cestodos intestinales em pacientes de consultórios y hospitales públicos Del sector norte de Santiago-Chile, 1985-1994. *Bol.Chil. Parasitol.* 50, 80-83.

Midzi N, Mtapuri-Zinyowera S, Mapingure M.P., Sangweme D, Chirehwa M.T., Brouwer K.C., et al. 2010. Consequences of polyparasitism on anaemia among primary school children in Zimbabwe. *Acta Trop.* 115:103–111.

Morales, G., M. A., Atzori, C., Ludovisi, A., Rossi, P. & Pozio, E. 1995. Opportunistic and non-opportunistic parasites in HIV-positive and negative patients with diarrhoea in Tanzania. *Trop. Med. Parasitol.*, 46, 109-114.

Morenikeji, O., Azubike, N., Ige A. 2009. Prevalence of intestinal and vector-borne urinary parasites in communities in south-west Nigeria. *J Vector Borne Dis.* 46, 164-167.

Mothershed, A.E., Whitney, M.A. 2005. Nucleic acid-based methods for detection of bacterial pathogens: present and future considerations for clinical laboratory: A review. *Clinica Chimica Acta*. 363, 206-220.

Mukherjee, A.K., Chowdhury, P., Bhattacharya, M.K., Ghosh M., Rajendran, K., Ganguly, S. 2009. Hospital-based surveillance of enteric parasites in Kolkata. *BMC Res. Notes*. 2, 110

- Muller, A., Bialek, R., Kamper, A., Fatkenheuer, G., Salzberger, B., Franzen, C. 2001. Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *J.Clin.Microbiol.* 39, 1630-1632.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzimol.* 155, 335-350.
- Mungthin, M., Subrungruang, I., Naaglor, T., Aimpun, P., Areekul, W., & Leelayoova, S., 2005. Spore shedding pattern of *Enterocytozoon bienersi* in asymptomatic children. *Journal of medical microbiology*, 54:473-476.
- Nantavisai, K., Mungthin, M., Tan-ariya, P., Rangsin, R., Naaglor, T., & Leelayoova, S., 2007. Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. *Journal of clinical microbiology*, 45: 581-583.
- Neto, V.A., Alarcón, R.S.R., Gakiya, E., Bezerra, R.C., Ferreira, C.S., Braz, L.M.A. 2003. Blastocitose: controvérsias e indefinições. *Rev Soc Bras Med Trop.* 35, 515-517.
- Neves, D.P. 2005. *Parasitologia Humana*. 11ª ed. Livraria Atheneu. São Paulo.
- Nevine, S., Mona, M., & Samar, S., 2012. Detection of *Cryptosporidium* infection among children with diarrhea. *New York Science Journal*, 5: 68-76.
- Newton, C.R. 1995. *PCR Essential Data*. West Sussex: John Willey & Sons Ltd.
- Nyarango, R.M., Aloo, P.A., Kabiru, E.W., Nyanchongi, B.O. 2008. The risk of pathogenic intestinal parasite infections in Kisii Municipality, Kenya. *BMC Public Health.* 8, 237.
- Nimri, L. F., 1993. Evidence of an epidemic of *Blastocystis hominis* infections in preschool children in northern Jordan. *Journal of clinical microbiology*, 31:2706-2708.
- Oliveira, D., Ferreira, F. S., Atougua, J., Fortes, F., Guerra, A., & Centeno-Lima, S., 2015. Infection by intestinal parasites, stunting and anemia in school-aged children from southern Angola. *PloS one*, 10:e0137327.

- O'lorcain, P., Holland, C.V. 2000. The public health importance of *Ascaris lumbricoides*. *Parasitology*. 121, 51-71.
- Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crabb, J.H., Sterling, C.R., Dupont, H.L. 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *The Journal of Infectious Diseases*. 180, 1275-1281.
- Ouattara, M., N'Guéssan, N. A., Yapi, A., & N'Goran, E. K., 2010. Prevalence and spatial distribution of *Entamoeba histolytica/dispar* and *Giardia lamblia* among schoolchildren in Agboville area (Côte d'Ivoire). *PLoS Neglected Tropical Disease*, 4: e574.
- Plano diretor Municipal (PDM). 2011. Pedra Badejo, Santiago, Cabo Verde.
- Prontuário de Medicamentos 2000. Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, Ministério Da Saúde de Portugal, INFARMED.
- Quadros, R.M., Marques, S., Arruda, A.A.R. 2004. Parasitas intestinais em centros de educação infantil municipal de Lages, SC, Brasil. *Revista Soc. Bras. de Medicina Tropical*. 37, 422-423.
- Quermi D, Karou D, Ouattara I, Gnoula C, Pietra V, Moret R, et al. 2012. Prevalence of intestinal parasites at Saint-Camille medical center in Ouagadougou (Burkina Faso), 1991 to 2010. *Med Sante Trop*. 22(1):40–4.
- Questionário unificado de indicadores básicos de bem-estar (QUIBB). 2007. INE, Cabo Verde.
- Radstrom, P., R. Knutsson, P. Wolffs, M. Lovenklev, AND C. Lofstrom. 2004. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol. Biotechnol.*, 26:133-146.
- Rafiei, A., Rashno, Z., Samarbafzadeh, A., & Khademvatan, S., 2014. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. Isolated from immunocompromised patients and children. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7:1-4.

- Ravdin, J.I. 1988. Amebiasis human infection by *Entamoeba histolytica*. *Churchill Livingstone*, New York.
- Raynaud, L., Delbac, F., Broussolle, V., Rabodonirina, M., Girault, V., Wallon, M., Cozon, G., Vivares, C.P., Peyron, F. 1998. Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. *J.Clin.Microbiol.* 36, 37-40.
- Redlinger, T., Corella, B.V., Graham, J., Galindo, A., Avitia, R., Cardenas, V. 2002. Hyperendemic *Cryptosporidium* and *Giardia* in households lacking municipal sewer and water on the United States-Mexico border. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Cleveland. 66, 794-798.
- Ministério de Saúde, 2010. Relatório Estatísticos da Saúde. Cabo Verde.
- Rey, L. 2002. Bases da Parasitologia Médica. 2ªed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Rey, L 2008, Parasitologia, 4ª ed, Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Ryan, U.; Fayer, R.; Xiao, L. 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*. 141, 1667-1685.
- Saathoff, E., Olsen, A., Kvalsvig, J., Appleton, C. 2004. Patterns of geohelminth infection, impact of albendazole treatment and re-infection after treatment in school children from rural KwaZulu-Natal/South-Africa. *BMC Infectious Diseases*. 4, 27.
- Ryan U., Hijjawi N. 2015. New developments in *Cryptosporidium* research. *Int. J. Parasitol.* 45 367–373.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis sickle cell anemia. *Science*. 230, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor.

- Samie, A., Obi, C. L., Tzipori, S., Weiss, L. M., & Guerrant, R. L., 2007. Microsporidiosis in South Africa: PCR detection in stool samples of HIV-positive and HIV-negative individuals and school children in Vhembe district, Limpopo Province. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101:547-554.
- Santin, M., Fayer, R. 2009. Enterocytozoon bienersi genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. *J.Eukaryot.Microbiol.* 56, 34-38.
- Senna, N.M.S., Mello, S.C.C., Barbosa, G.L.S., Dias, B., Lorca, F.O., Simões, L.G. 2001. Ações educativas para a prevenção de parasitoses aplicadas em escolas no município de Nova Iguaçu, RJ, Brasil. XV Congresso Latino-americano de Parasitologia, São Paulo.
- Santos, A. A. M., 2003. Controle de infecção: necessidade de novos conceitos. *Revista Prática Hospitalar*, 5:208-28.
- Savioli, L., Smith, H., Thompson, A., 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected Disease Initiative". *Trends Parasitology*, 22:203-208.
- Serralheiro, A. 1976. A Geologia da ilha de Santiago (Cabo Verde). Boletim do Museu do Laboratório Mineralógico e Geológico da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa 14, 218.
- Shamsuzzaman, S.M., Haque, R., Hasin, S.K., Hashiguchi, Y. 2000. Evaluation of indirect fluorescent antibody test as enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of hepatic amebiasis in Bangladesh. *J Parasitol.* 86, 611-615.
- Sherchand, S. P., Joshi, D. R., Adhikari, N., Poudel, R. C., Pant, K. P., KC, M., Shrestha, D. & Sherchanet, S., 2016. "Prevalence of *Cryptosporidiosis* Among School Going Children in Kathmandu, Nepal". *EC Microbiology* 4.1: 641-646.
- Smith, H.V., Rose, J. B. 1998. Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitol Today*. 14, 14-22.

Solomons, N.W. 1993. Pathways to the impairment of human nutritional status by gastrointestinal pathogens. *Parasitol.* 107, S19 - S35.

Souza, A. I., Ferreira, L. O. C., Batista Filho, M., & Dias, M. R. F. S., 2002. Enteroparasitoses, anemia e estado nutricional em grávidas atendidas em serviço público de saúde. *Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia*, 24: 253-259.

Staufferet, M., Abd-Alla, J., Ravdin, J. 2006. Prevalence and Incidence of *Entamoeba histolytica* Infection in South Africa and Egypt. *Archives of Medical Research.* 37, 265-268.

Steenhard, N. R., Ørnbjerg, N., & Mølbak, K., 2009. Concurrent infections and socioeconomic determinants of geohelminth infection: a community study of schoolchildren in periurban Guinea-Bissau. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103:839-845.

Stenzel, D. J., & Boreham, P. F., 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, 9:563-584.

Sulaiman, I.M., Fayer, R., Lal, A.A., Trout, J.M., Schaefer, F.W., Xiao, L. 2003. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals Harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Appl.Environ.Microbiol.* 69, 4495-4501.

Sulaiman, I.M., Fayer, R., Yang, C., Santin, M., Matos, O., Xiao, L. 2004. Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle indicates that only some isolates have zoonotic potential. *Parasitol.Res.* 92, 328-334.

Sullivan, P.B., Marsh, M.N., Phillips, M.P., Dewit, O., Neale, G., Cevalhos, A.M., Yamson, P., Farthing, M.J.G. 1990. Prevalence and treatment of giardiasis in chronic diarrhoea and malnutrition. *Archives of Disease in childhoos.* 65, 304-306.

Suriptiastuti and MananW.S. 2011. Intestinal parasites from fingernails of sidewalk food vendors. *UniversaMedicina*; 30:120-125.

- Tanyuksel, M., Yilmaz, H., Ulukanligil, M., Araz, E., Cicek, M., Koru, O., Tas Z., Petri, W.A.J. 2005. Comparison of two methods (microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of amebiasis. *Experimental Parasitology*. 110, 322-326.
- Tanyuksel, M., Petri, W.A.J. 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 16, 713-729
- Teixeira, J. C., Heller, L., & Barreto, M. L., 2007. *Giardia duodenalis* infection: risk factors for children living in sub-standard settlements in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 23:1489-1493.
- Ten Hove, R. J., van Esbroeck, M., Vervoort, T., van den Ende, J., Van Lieshout, L., & Verweij, J. J., 2009. Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travellers. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 28:1045-1053.
- Thellier, M., Breton, J. 2008. *Enterocytozoon bienersi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite*. 15, 349-358.
- Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J., Meloni, B.P. 1990. Genetic variation in *Giardia*. *Protozool Abstracts*. 14, 1-28.
- Thompson, R.C.A., Constantine, C.C., Morgan, U.M. 1998. Overview and significance of molecular methods: what role for molecular epidemiology. *Parasitology*. 117, S161-175.
- Tobar, F. 2001. Como fazer teses em saúde pública. Editora fiocruz. Rio de Janeiro, Brasil.
- Tumwine, J. K., Kekitiinwa, A., Bakeera-Kitaka, S., Ndeezi, G., Downing, R., Feng, X., Akiyoshi, D. E. & Tzipori, S., 2005. *Cryptosporidiosis* and *microsporidiosis* in Ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 73: 921-925.

Tumwine, J. K., Kekitiinwa, A., Nabukeera, N., Akiyoshi, D. E., Buckholt, M. A., & Tzipori, S., 2002. *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago Hospital in Uganda. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 67: 299-303.

Uecker M., Copetti C., Poleze L., Flores V. 2007; Parasital Infection: immunologic diagnostic of enteroparasitosis; RBAC. 39, 15-19.

Ungar, B.L., Gilman, R.H. Lanata, C.F., Perez, S.I. 1988 Seroepidemiology of *Cryptosporidium* infection in two Latin American populations. *The Journal of Infectious Diseases, Boston*. 157, 551-556.

Vandenberg, O., Van Laethem, Y., Souayah, H., Kutane, W. T., Van Gool, T., & Dediste, A., 2005. Improvement of routine diagnosis of intestinal parasites with multiple sampling and SAF-fixative in the triple-faeces-test. *Acta gastro-enterologica Belgica*, 69: 361-366.

Vieira P, 2012. “Caracterização genética de *Cryptosporidium* spp. em amostras biológicas de humanos e animais provenientes da Roménia: comparação com as características dos organismos obtidos das populações humana e animal portuguesa”. Tese de dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

Xiao, L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*. 124, 80-89.

Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R. H. & Lal, A. A., 2001. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases*, 183:492-497.

Xiao, L., Cama, V. 2006. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. In Ortega, Y. Foodborne Parasites: Food Microbiology and Food Safety, *Griffin*.

Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R., Lal, A.A. 1999. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the

small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 1578-1583.

Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 72-97.

Ximénez, C. 2006. Epidemiology of Amebiasis in Mexico: A Molecular Approach. *Archives of Medical Research*. 37, 263-265.

Yakoob, J., Jafri, W., Jafri, N., Khan, R., Islam, M., Beg, M. A., & Zaman, V., 2004. Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70: 383-385.

Waldron, L.S., Ferrari, B.C., Cheung-Kwok-Sang, C., Beggs, P.J., Stephens, N. Power, M. L. 2011. Molecular epidemiology and spatial distribution of a waterborne cryptosporidiosis outbreak in Australia. *Appl Environ Microbiol.* 77, 7766-71.

Walsh, J.A., 1986. Amebiasis in the world. *Archivos de Investigación Médica*. 17, 385-389.

Wanachiwanawin, D., Chokephaibulkit, K., Lertlaituan, P., Ongrotchanakun, J., Chinabut, P., & Thakerngpol, K., 2002. Intestinal microsporidiosis in HIV-infected children with diarrhea. *Southeast Asian journal of tropical medicine and hygiene. Public Health*: 33, 241-245.

Wanke, C.A., DeGirolami, P.C., Federman, M. 1996. *Enterocytozoon bieneusi* and diarrheal disease in patients who were not infected with human immunodeficiency virus: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* 23, 816-818.

Weber, R., Bryan, R.T., Bishop, H.S. 1991. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *J Clin Microbiol.* 29, 1323-7.

Weber, R., Bryan, R.T., Schwartz, D.A. 1994 Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Ver.* 7, 426-461.

Weiss, L.M., Vossbrinck, C.R. 1999. Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia. In Wittner, M., Weiss, L.M. The Microsporidia and Microsporidiosis. *American Society for Microbiology*. 129-171.

White, A.C., JR. 2003. Nitazoxanide: an important advance in anti-parasitic therapy. *Am J Trop Med Hyg*, 68, 382-3.

WHO. 2006. The WHO Child Growth Standards. www.who.int/childgrowth/en.

WHO/CDC. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005, 2008. WHO Global database on anaemia. Geneva, World Health Organization,

WHO. 2005. Deworming for health and development. Report of the third global meeting of the partners for parasite control. World Health Organization, Geneva

WHO. 2011. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva: WHO, URL: <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>.

WHO/UNICEF/UNU. 2011. Iron deficiency anaemia assessment, prevention and control: a guide for programme managers. Geneva, World Health Organization,

Wichro, E., Hoelzl, D., Krause, R., Bertha, G., Reinthaler, F., Wenisch, C. 2005. Microsporidiosis in travel-associated chronic diarrhea in immune-competent patients. *Am.J.Trop.Med.Hyg*. 73, 285-287.

ANEXOS

ANEXO 1 – Questionário



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



Direção Geral da Saúde
Delegacia de Saúde de Santa Cruz

Monitorização da ocorrência de enteroparasitoses e de anemia em crianças em idade escolar, e caracterização molecular dos isolados, em Salina-Pedra Badejo, Ilha de Santiago, Cabo-Verde

Número: _____

Turma: _____

Data ____/____/____

Dia mês ano

Nome: _____

Sexo: M ☐ F ☐

Naturalidade: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

Peso para a idade: < 60%

60 – 74,9%

Imunossupressão: • Sim ☐

• Não ☐

≥ 75%

Altura para a idade: < 85%

Médico Assistente: _____

85 – 89,9%

90 – 94,9%

Nº Processo: _____

≥ 95%

PRESENÇA DE SINTOMAS

Sem sintomas: Sim ☐ Não ☐

Febre: Sim ☐

Não ☐

Diarreia: Sim ☐

Não ☐

Dores abdominais: Sim ☐

Não ☐

Vómitos: Sim ☐

Não ☐

Dores de cabeça: Sim ☐

Não ☐

Já teve diarreia alguma vez? _____ Quando? _____

Fez tratamento com anti-parasitário? _____

1ª Colheita de fezes (data) _____ 2ª Colheita de fezes (data) _____

INFORMAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

Encarregado de Educação: Mãe _____ Pai _____ Outro _____

Grau de escolaridade do Encarregado de Educação _____

Tipo de casa: Térrea _____ Apartamento _____

Qual o tipo de abastecimento de água na residência?

Canalizada: Sim ☐
Não ☐

Poço: Sim ☐
Não ☐

Qual o destino do esgoto?

Rede de esgoto: Sim ☐
Não ☐

Céu-aberto: Sim ☐
Não ☐

Fossa: Sim ☐
Não ☐

Colheita de lixo: Sim ☐ Não ☐

Hábitos de defecação da criança - nas proximidades da casa ☐

- na casa de banho ☐

- lava as mãos após ir à casa de banho? _____

Tem animais domésticos em casa? _____ Quais? _____

Há roedores junto à casa? Sim ☐ Não ☐

Conservação dos alimentos - em frigorífico: Sim ☐ Não ☐

ANEXO 2 – Termo de consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CRIANÇAS E ADOLESCENTES (de 4 a 16 anos)

Título da pesquisa: Monitorização da ocorrência de enteroparasitoses e de anemia em crianças em idade escolar, e caracterização molecular dos isolados, em Salina-Pedra, Ilha de Santiago, Cabo-Verde

Investigadora participante: MÓNICA SOFIA NEVES GARCIA

Eu, _____, abaixo assinado, dou o meu consentimento livre e esclarecido para participação do meu (minha) filho (filha) como voluntário (a) do projeto de investigação supra-citado, sob a responsabilidade da Investigadora Olga Matos (Portugal) e da co-investigadora Mónica Sofia Neves Garcia, bióloga Cabo-verdiana, e mestranda do curso de Parasitologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, Portugal (IHMT-UNL).

Assinado este Termo de Consentimento estou ciente de que:

1. O objetivo da investigação visa: verificar a prevalência de parasitoses intestinais em crianças matriculadas na *Escola básica e primária Cristil Zach de Salina, Santa Cruz*, e analisar a diversidade genética dos parasitas identificados.

2. Durante o estudo realizarei:

2.1 Colheita de 2 (duas) amostras de fezes, em dias alternados, armazenadas em frasco apropriado **fornecido pela investigadora;**

2.2 Encaminhar a 1ª amostra do material colhido à escola, no dia ____/____/____, das ____ às ____ horas;

2.3 Encaminhar a 2ª amostra do material colhido à escola, no dia ____/____/____, das ____ às ____ horas;

3. Obtive todas as informações necessárias para poder decidir consentimento sobre a participação do(a) meu (minha) filho (filha) no referido estudo;

4. Estou livre para interromper a qualquer momento a participação do meu (minha) filho (a) no estudo, a não ser que esta interrupção seja contra-indicada por motivo médico;

5. Os dados pessoais do meu(minha) filho(a) serão mantidos em sigilo e os resultados gerais obtidos através deste estudo serão utilizados apenas para alcançar os objetivos do trabalho, expostos acima, incluída sua publicação na literatura científica especializada;

6. Em caso de dúvidas ou esclarecimentos, poderei entrar em contacto com a investigadora Mónica Sofia Neves Garcia, Telefone:

7. Não existirá despesas ou compensações pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à participação do(a) meu(minha) filho(a).

Salina-Pedra, ____/____/____.

Assinatura do pai ou mãe ou responsável

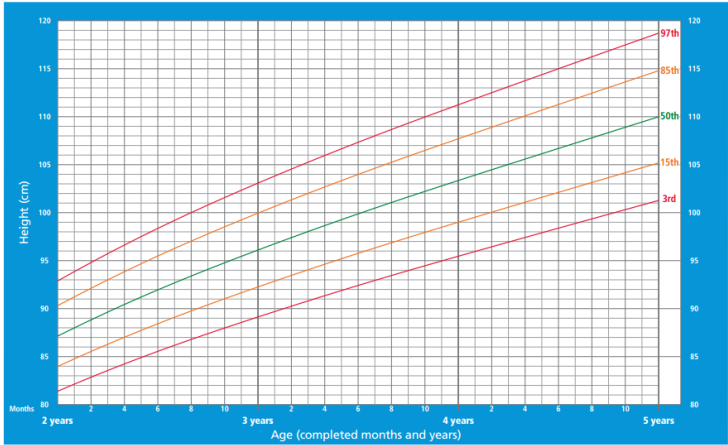
Assinatura da investigadora

Nome da criança: _____

ANEXO 3 – Curva de referência altura e Peso a para idade de meninos e meninas dos 2 aos 5 anos

Height-for-age BOYS

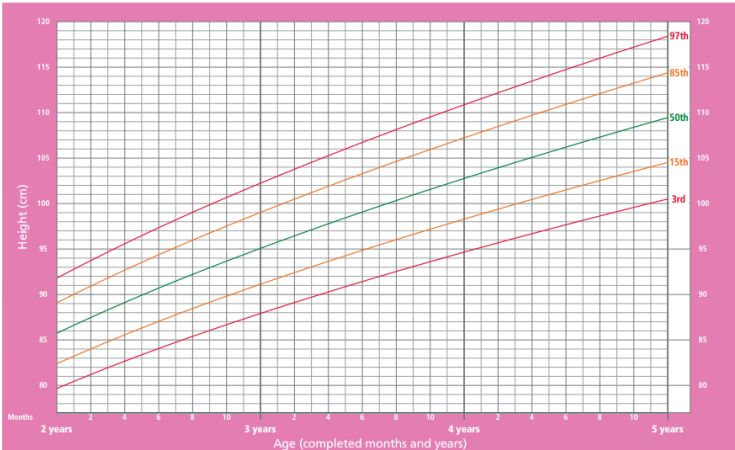
2 to 5 years (percentiles)



WHO Child Growth Standards

Height-for-age GIRLS

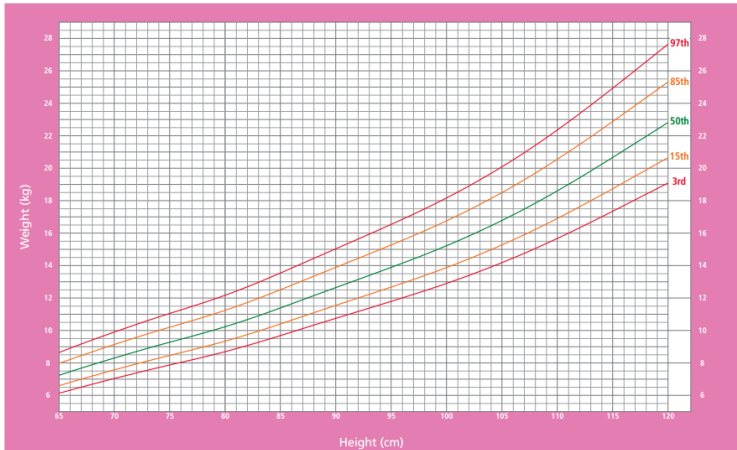
2 to 5 years (percentiles)



WHO Child Growth Standards

Weight-for-height GIRLS

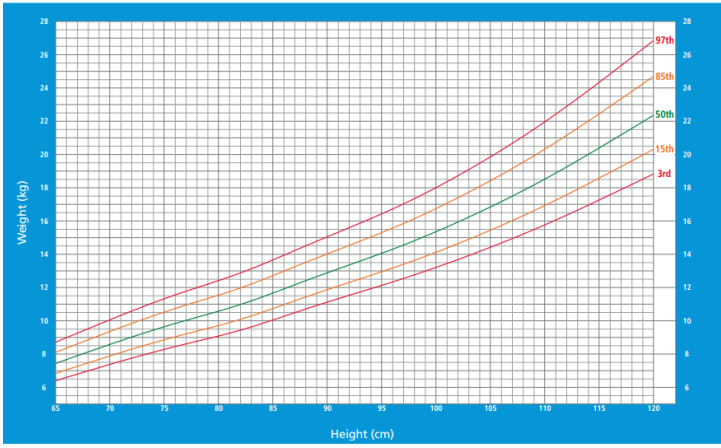
2 to 5 years (percentiles)



WHO Child Growth Standards

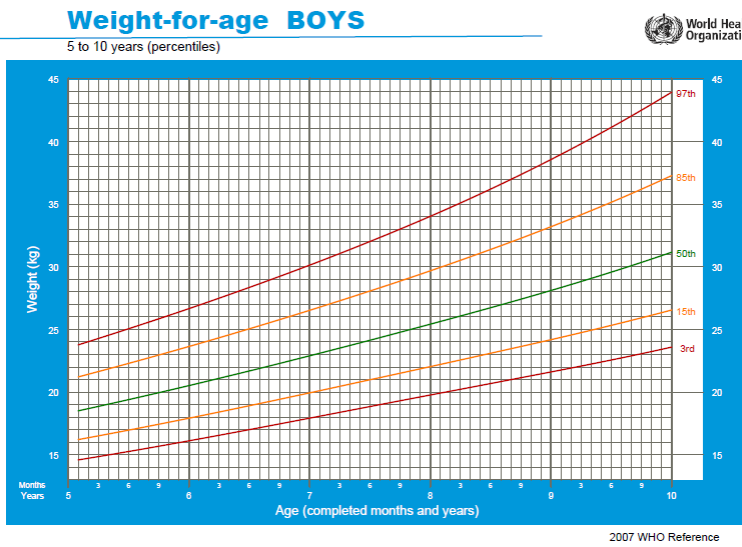
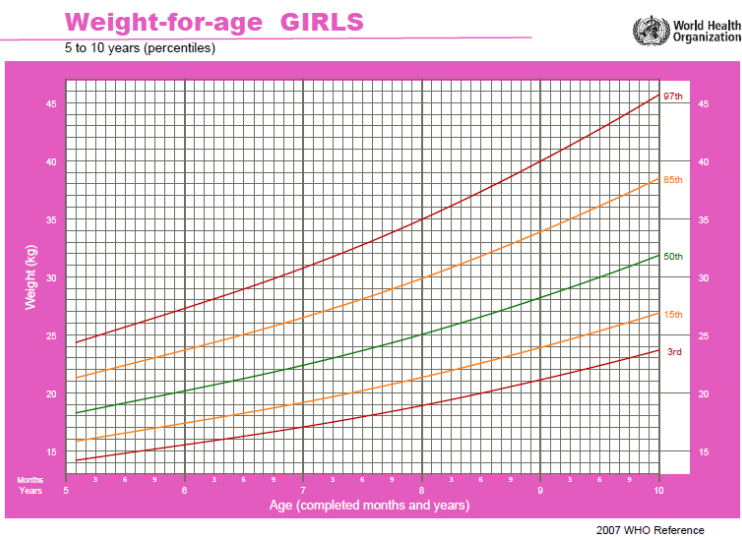
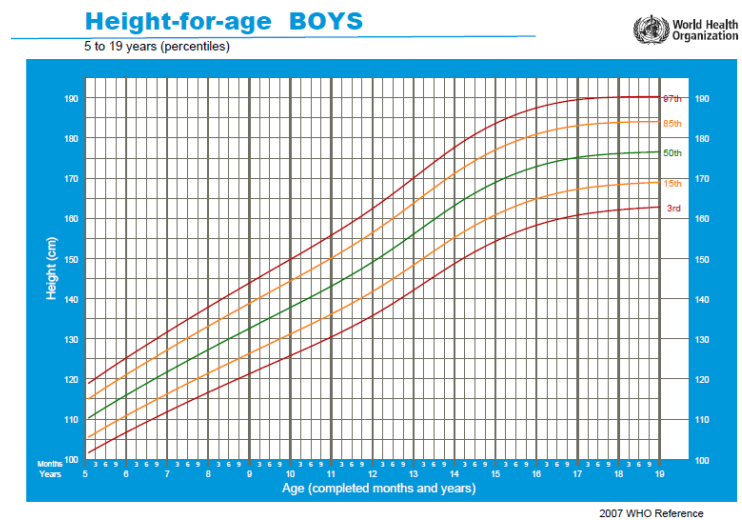
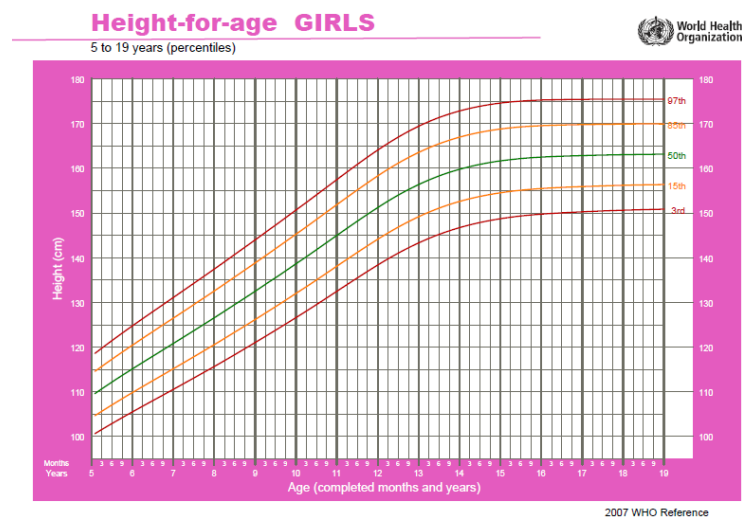
Weight-for-height BOYS

2 to 5 years (percentiles)



WHO Child Growth Standards

Curva de referência Altura e Peso a para idade de meninos e meninas dos 5 aos 19 anos



ANEXO 4 – Parecer para a realização do estudo



COMITÉ NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA PARA A SAÚDE

(CNEPS)

Deliberação nº 63/2015

1-Foi submetido , nos termos do artigo 5º do Decreto-Lei nº 26/2007, de 30 de Julho, para apreciação do Comité Nacional de Ética em Pesquisa para a Saúde (CNEPS), o projecto de pesquisa intitulado: ***“Monitorização da Ocorrência de enteroparasitoses e de anemia em crianças em idade escolar ,e caracterização molecular dos isolados, em Salina-Pedra Badejo,na Ilha de Santiago, Cabo-Verde”***pela Professora Olga Matos, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa.

2- O projecto enquadra-se numa tese de Mestrado de Mónica Sofia Neves Garcia, cabo-verdiana que está a fazer o mestrado em Parasitologia Médica, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, sob a orientação da Professora Olga Matos.MD, sendo co-orientadora a doutora Maria Luisa Costa, com a colaboração da Delegacia de Saúde de Santa Cruz , Direcção Nacional de Farmácia ,Escola Básica e Primária Cristil Zach de Salina, Santa Cruz e o Departamento de Ciências e Tecnologia da Universidade de Cabo-Verde.

3- O CNEPS fez a análise documental e técnica da proposta na sua 57.ª Reunião Ordinária, realizada a 24 de Setembro de 2015, nomeadamente:

- Carta de submissão do projecto ao parecer do CNEPS
- Projecto de Pesquisa
- O Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- O curriculum vitae da Orientadora e da mestranda.
- ACORDO ESPECIFICO ENTRE O INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL E A UNIVERSIDADE DE CABO-VERDE (DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA)
- E-mails comprovativos dos contactos com a Delegada de Saúde e o Gestor do Pólo Educativo NºXIII Salina/Escola Cristil Zach e que comprovam o seu engajamento ao estudo.

4-O CNEPS delibera no sentido da aprovação do projecto de investigação, por cumprir todos os requisitos éticos, ao abrigo do artigo nº11 do decreto-lei nº26/2007,devendo as investigadoras manter o CNEPS informado do andamento dos trabalhos e dos resultados alcançados.

Praia,25 de Setembro de 2015

A Presidente do CNEPS
Maria da Conceição Moreira de Carvalho
Maria da Conceição Moreira de Carvalho

